

MASTEROPPGAVE FOR GRADEN

*Master i Farmasi*

# **Effekter av ILAV-infeksjon på stressresponsgener i Atlantisk laks (*Salmo salar* L.)**

*En sammenligning av høypatogene og lavpatogene ILAV-isolat*

**Lene Cecilie Poulsen**



**Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap**

**Farmasøytisk Institutt**

**Det Matematisk- og Naturvitenskapelige Fakultet**

**Universitetet i Oslo**

**Mai 2008**

---

## Forord

Dette mastergradsarbeidet ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap ved Universitetet i Oslo, i tidsrommet august 2007 til mai 2008.

Jeg vil gjerne takke min veileder Professor Tor Gjøn for et faglig inspirerende og minnerikt år. Du har alltid hatt tid til å svare på spørsmål, og gitt god veiledning og masse oppmuntring under hele denne perioden.

En stor takk til Anne-Lise Rishovd for hjelp med labarbeidet og ditt alltid gode humør.

Jeg vil også gjerne takke Ph.D. Berit Schiøtz Syvertsen for hyggelige samtaler og tips i det praktiske labarbeidet.

Takk til mine medstudenter Eirin, Liv og Ingrid for mange gode faglige og mindre faglige samtaler på lesesalen. Dere har vært en viktig del av hverdagen, og bidratt til å gjøre dette til et utrolig koselig og morsomt år.

Til slutt vil jeg gjerne rette en stor takk til venner og familie som alltid har stilt opp for meg og kommet med mange gode råd, oppmuntring og skryt gjennom hele studietiden.

Oslo, mai 2008

Lene Cecilie Poulsen

---

## Sammendrag

Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV) er et akvatisk orthomyxovirus som forårsaker en multisystemisk sykdom i oppdrettslaks (*Salmo salar* L.), noe som fører til store økonomiske tap for oppdrettsnæringen. Sykdomsutbrudd varierer i stor grad med hensyn på sykdomsforløp og kliniske tegn. Europeiske ILAV-isolat kan grupperes i forhold til om de forårsaker en akutt eller kronisk sykdom, og i tillegg kan de genotypes på bakgrunn av delesjonsmønster i HPR, hvor de fleste sekvenser som tilhører en gitt HPR-gruppe stammer fra utbrudd med liknende sykdomsutvikling. Selv om to ILAV-isolat tilhører den samme gruppen kan de likevel forårsake en ulik patogenisitet *in vivo*.

I denne oppgaven ønsket vi å undersøke om det var forskjeller mellom ILAV-isolatenes evne til å aktivere noen av de medfødte cellulære immunresponser som kan bidra til å gi en forklaring på den ulike patogenisiteten som observeres *in vivo*. En bedre forståelse av patogenisiteten til ILAV vil kunne gi et bedre grunnlag for å utvikle effektive vaksiner mot viruset. ASK-celler ble infisert med to høypatogene og to lavpatogene ILAV-isolat, henholdsvis ILAV 2 og ILAV 4 samt ILAV 7 og ILAV 10. Tre dager etter at cellene ble infisert, ble ekspresjon av et utvalg gener analysert ved bruk av sanntids kvantitativ PCR, og i tillegg ble kvantitet og eventuell grad av fosforylering til utvalgte signalproteiner studert ved hjelp av westernblotting.

De ulike ILAV-isolatene induserte ekspresjon av stort sett de samme genene, men i ulik grad. Det ble observert en kraftig induksjon av interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) og de interferoninduserte genene ISG-15 og MX i celler infisert med det høypatogene isolatet ILAV 4, mens celler infisert med ILAV 2 derimot, viste en lav oppregulering av de samme genene. Genekspresjonen av Hsp 70, som kan indusere proliferering av CD4 T-celler og CD8 T-celleresponser, var mest oppregulert i celler infisert med de lavpatogene isolatene. Dette kan indikere at ILAV 7 og ILAV 10 induserer en kraftigere stimulering av det adaptive immunsystemet enn ILAV 2 og ILAV 4. Oppreguleringen i genekspresjon ble derimot ikke gjenspeilet på proteinnivå, noe som gjør denne observasjonen tvilsom. Det ble heller ikke observert en forskjell i fosforylering av stressrespons-proteinene p38 og ERK.

---

# Innhold

<b>FORORD .....</b>	<b>II</b>
<b>SAMMENDRAG .....</b>	<b>III</b>
<b>INNHold .....</b>	<b>IV</b>
<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>1</b>
1.1 ORTHOMYXOVIRIDAE .....	1
1.1.1 Virionstruktur.....	2
1.2 INFEKSJØS LAKSEANEMI VIRUS (ILAV).....	3
1.2.1 Bakgrunn.....	3
1.2.2 Genom og struktur .....	5
1.2.3 Genetisk variasjon hos ILAV.....	7
1.3 INTERFERONRESPONSEN VED EN VIRUSINFEKSJON .....	8
1.3.1 Aktivering av interferonsystemet.....	8
1.3.2 Virale interferon-antagonist proteiner.....	10
1.4 APOPTOSE .....	10
1.4.1 Mekanismer for apoptose.....	11
1.4.2 Influenzavirus og apoptose .....	12
1.5 IMMUNOLOGISKE OG APOPTOTISKE GENER SOM ER ANALYSERT .....	13
1.6 MÅL FOR OPPGAVEN.....	21
<b>2. MATERIALER.....</b>	<b>22</b>
2.1 KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER .....	22
2.2 LØSNINGER .....	25

---

2.3	KIT .....	29
2.4	CELLER OG VIRUS.....	29
2.5	ANTISTOFFER.....	30
2.6	PRIMERLISTE.....	31
<b>3.</b>	<b>METODER .....</b>	<b>34</b>
3.1	CELLEDYRKNING .....	34
3.2	INFISERING AV ASK-CELLER MED ILAV .....	34
3.3	RNA-ISOLERING .....	34
3.4	cDNA-SYNTASE.....	35
3.5	PROTEINISOLERING .....	36
3.6	MÅLING AV PROTEINKONSENTRASJON .....	36
3.7	WESTERNBLOTTING .....	37
3.8	SANNTIDS REVERS TRANSKRIPTASE PCR (SANNTIDS RT-PCR).....	39
3.9	DATA-ANALYSE OG STATISTIKK.....	43
3.10	KONTROLL AV PCR-PRODUKT .....	44
3.11	SEKVENSERING AV PCR-PRODUKT .....	44
3.11.1	<i>Direkte sekvensering.....</i>	<i>44</i>
3.11.2	<i>Kloning av PCR-produkt ved hjelp av TOPO TA kloningskit.....</i>	<i>47</i>
3.12	IMMUNOFLUORESCENS.....	48
<b>4.</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>50</b>
4.1	SEKVENSERING AV DET HYPERVARIABLE OMRÅDET (HPR) TIL ILAV 2, 4, 7 OG 10.....	50
4.2	VURDERING AV ISOLATENES EVNE TIL Å INFISERE ASK-CELLER .....	51
4.3	GELELEKTROFORESE AV PCR-PRODUKT .....	53
4.4	SEKVENSERING AV PCR-PRODUKT .....	54

---

4.5	RELATIV EKSPRESJON AV UTVALGTE GENER I ASK-CELLER INFISERT MED ILAV 2, 4, 7 OG 1056	
4.6	WESTERNBLOTING .....	72
<b>5.</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>76</b>
5.1	DISKUSJON AV METODER.....	76
5.1.1	<i>ASK-cellelinjen</i> .....	76
5.1.2	<i>Sanntids kvantitativ PCR</i> .....	76
5.1.3	<i>Westernblotting</i> .....	77
5.2	DISKUSJON AV RESULTATER.....	77
5.2.1	<i>ASK-cellelinjen: Viral infeksjon og replikasjon</i> .....	78
5.2.2	<i>Forskjeller i genekspresjon i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10</i> .....	78
5.2.3	<i>Proteinekspresjon av stressrespons-proteinene p38 og ERK</i> .....	87
5.2.4	<i>Proteinekspresjon av hemagglutinin-esterase</i> .....	88
<b>6.</b>	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>90</b>
	<b>KILDELISTE .....</b>	<b>91</b>
	<b>VEDLEGG 1 .....</b>	<b>98</b>
	<b>VEDLEGG 2 .....</b>	<b>99</b>
	<b>VEDLEGG 3 .....</b>	<b>100</b>

---

## Forkortelser

ad	Opp til
Apaf-1	Apoptose proteaseaktiverende faktor-1
APS	Ammonium persulfat
ASK	Atlantic salmon kidney
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
BSA	Bovint serumalbumin
cDNA	Komplementært DNA
COX-2	Cykloxygenase-2
CPE	Cytopatisk effekt
Ct	Terskelverdi
DISC	Dødsinduserende signalkompleks
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ds	Dobbeltrådet
EF1- $\alpha$	Elongeringsfaktor 1- $\alpha$
EIF-2	Eukaryot initieringsfaktor-2
ERK	Ekstracellulær signalregulert kinase
EtBr	Etidiumbromid
FADD	Fas-assosiert dødsdomene
Fip-2	Fourteen kilodalton interacting protein 2
HA	Hemagglutinin
HE	Hemagglutinin-esterase
HPR	Hypervariabelt område
HRP	Pepperrotperoksidase
Hsp	Heat shock protein

---

IAP	Inhibitor of apoptosis
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILA	Infeksiøs lakseanemi
ILAV	Infeksiøs lakseanemi virus
IPNV	Infeksiøs pankreas nekrose virus
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalaktosid
IRF-3	Interferon respons-faktor 3
ISG	Interferon-stimulert gen
JKN	Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
M1	Matriks protein 1
M2	Matriks protein 2
MAPK	Mitogen-aktivert protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1 protein
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger RNA
MQ	Milli-Q
NA	Neuraminidase
NF $\kappa$ B	Nukleær faktor kappa B
NP	Nukleoprotein
NS	Ikke-strukturelt protein
OGFr	Opioid vekstfaktor-reseptor
ORF	Åpen leseramme
PB	Poylmeraseprotein
PBS	Fosfat-bufret saltvann



---

PCR	Polymerase kjedereaksjon
PDCD5	Programmed cell death protein 5
PKR	Protein kinase R
Poly I:C	Syntetisk dobbelttrådet RNA
REST	Relative expression software tool
RNA	Ribonukleinsyre
RNP	Ribo-nukleo protein
rpm	Omdreiningar per minutt
RT-PCR	Revers transkriptase-PCR
SDS	Natrium dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium dodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
ss	Enkelttrådet
TAL	Transaldolase
T <sub>H</sub> 1-celle	T-hjelpecelle 1
TLR3	Toll-liknende reseptor 3
TNF	Tumor nekrose faktor
TRAIL	TNF-relatert apoptose-induserende ligand

---

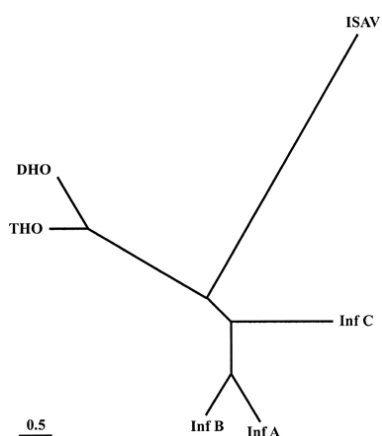
# 1. INNLEDNING

## 1.1 *Orthomyxoviridae*

*Orthomyxoviridae* er en familie av RNA-virus som består av fem genera: Influensavirus type A, influensavirus type B, influensavirus type C, flåttbårne *thogotovirus* og marine *isavirus*.

Orthomyxovirus er enkelttrådet kappevirus med segmentert, negativt RNA. Det genomiske RNAet har to funksjoner: det fungerer som templat for syntese av messenger RNA (mRNA) og for syntese av den antigenomiske (+) tråden, som er en kopi av det fullstendige virale genomet (for influensavirus kalles det ofte templat RNA eller komplementært RNA (cRNA)). Negativt orienterte RNA-virus både koder for og inneholder en egen RNA-avhengig RNA-transkriptase som produserer viralt mRNA etter infeksjon. Virusreplikasjon finner sted etter syntese av mRNA og krever en pågående syntese av virale proteiner. Den nysyntetiserte antigenomiske (+) tråden fungerer som templat for nye kopier av den (-) genomiske tråden (Fields *et al.*, 2007)

Det mest konserverte proteinet i orthomyxofamilien er polymeraseproteinet PB1. Dette proteinet kan derfor benyttes for å evaluere den evolusjonære avstanden mellom infeksjons lakseanemi virus (ILAV) og andre medlemmer av orthomyxofamilien.



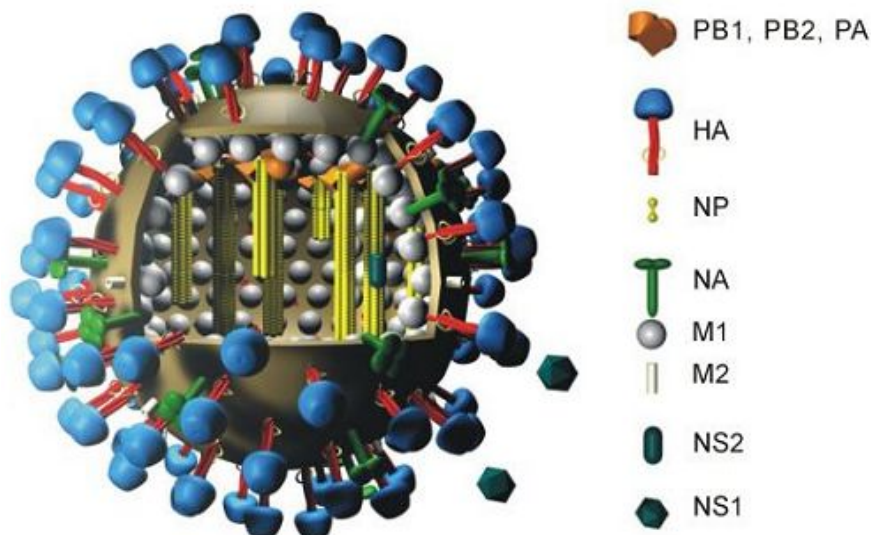
**Figur 1.1 Genetisk distanse tre.** Sammenhengen mellom orthomyxovirusene basert på polymeraseproteinet PB1. Figuren er hentet fra (Krossoy *et al.*, 1999).

---

Beregninger av distansene mellom de ulike PB1 proteinene indikerer at ILAV er nærmere beslektet influensavirus enn thogotovirus (Krossoy *et al.*, 1999).

### 1.1.1 Virionstruktur

Influensavirus er pleiomorfe virus som karakteriseres av et segmentert, negativt RNA genom omsluttet av en lipidmembran. Influensavirus type A og B skilles på bakgrunn av to integrerte membranglykoproteiner, hemagglutinin (HA) og neuraminidase (NA), mens influensavirus type C derimot, kun har ett membranglykoprotein, hemagglutinin-esterase fusjonsprotein (HEF). Genomet til influensavirus type A består av åtte gensegmenter som koder for ni strukturelle og ett ikke-strukturelt protein.



**Figur 1.2** Strukturen til et influensavirion type A. Figuren er hentet fra (Gürtler, 2006).

HA utgjør ca. 25 % av de virale proteinene og er jevnt fordelt på virionoverflaten. Proteinet er ansvarlig for at viruset kan feste til, og videre tas inn i vertscellen. NA er i likhet med HA også fordelt på virionoverflaten hvor det katalyserer spalting av sialinsyre fra glykoproteiner, noe som er viktig i forbindelse med både inntrenging og frigjøring av nydannede virions fra cellen.

På innsiden av lipidkappen finner man matriks (M1) protein, RNA-segmenter som er assosiert med nukleoprotein (NP) og tre store polymerase proteiner, PA, PB1 og PB2. NP er et type-spesifikt antigen som er assosiert med viralt RNA. Både polymeraseproteinene og NP er viktige ved RNA-replikasjon som finner sted i kjernen, samt ved transkripsjon. M1

---

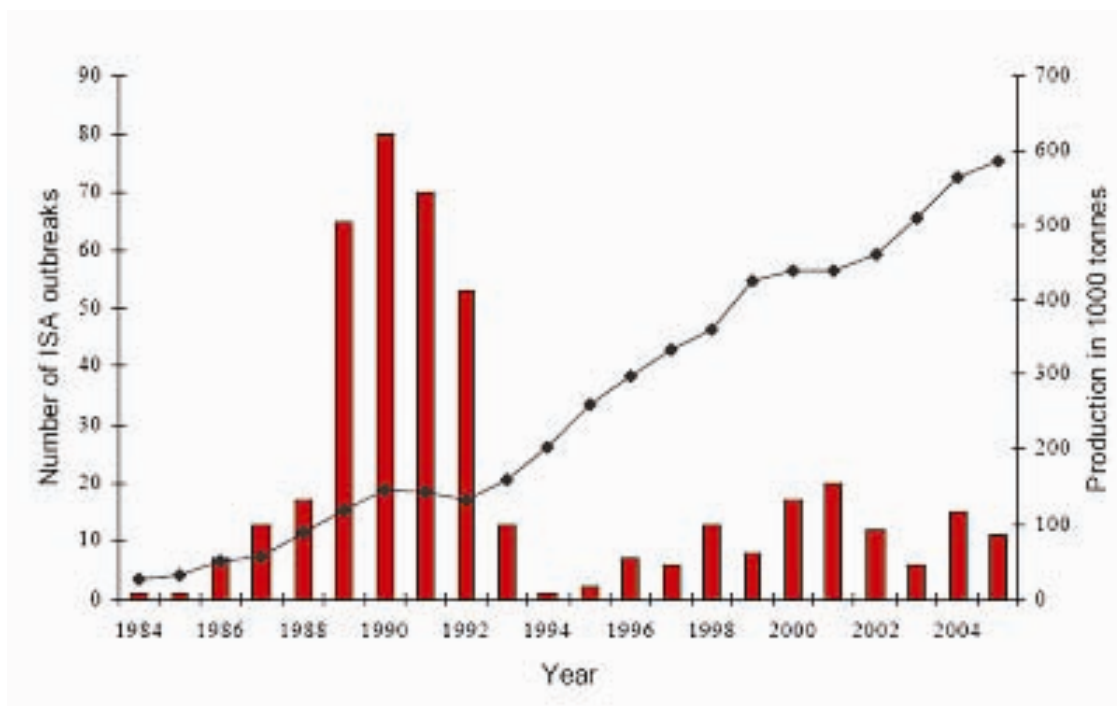
proteinet er lokalisert både i kjernen og i cytoplasma. Proteinet er kritisk for eksport av vRNP-komplekser (komplekser av viralt RNA, NP og de tre polymeraseproteinene, PA, PB1 og PB2 kalles ribonukleoprotein (RNP)) fra kjernen, i tillegg til at det bidrar til morfologien til influensavirions (Neumann og Kawaoka, 2007). M2-proteiner danner en pH-sensitiv protonkanal i den virale lipidkappen. Den lave pH i endosomet aktiverer M2-kanalen noe som fører til surgjøring av den virale innsiden. Dette fasiliterer dissosiasjon av matriks-proteiner fra virale NP, hvilket er nødvendig for eksponering av det virale genomet. I tillegg forhindrer M2 i *trans*-Golgi-nettverksmembranen en prematur konformasjonsendring av nysyntetisert HA (Schnell og Chou, 2008).

NS1 er det eneste ikke-strukturelle proteinet til influensavirus type A. Proteinet produseres i store mengder tidlig i infeksjonsforløpet, hvor det binder til dobbelttrådet RNA og forhindrer aktivering av interferonindusert protein kinase R (PKR) og transkripsjonsfaktorer. Dette indikerer at proteinet er involvert i å forhindre en interferonmediert antiviral respons. NS2 fungerer sannsynligvis som et viralt kjerne-eksport protein og finnes i virions, samt i kjernen og cytoplasma til infiserte celler (Neumann og Kawaoka, 2007).

## 1.2 Infeksiøs lakseanemi virus (ILAV)

### 1.2.1 Bakgrunn

Infeksiøs lakseanemi (ILA) er en viral sykdom som ble oppdaget i Norge i 1984 i laks fra et oppdrettsanlegg. Angrepne fisk var kraftig anemiske, derav sykdommens navn, og i tillegg hadde fiskene typiske makroskopiske lesjoner inkludert ascites, petekkier på indre organer og hemorragisk levernekrose. Antall ILA-utbrudd i Norge økte jevnt over de neste årene, og nådde en topp i 1990 hvor viruset ble påvist i 80 oppdrettsanlegg. I løpet av første halvdel av 1990-tallet ble antall utbrudd kraftig redusert på grunn av nye regulatoriske tiltak (økt fokus på smitteveier og sanitære forhold), men de seneste årene har sykdommen blusset opp igjen. ILAV har også blitt påvist i lakseoppdrettsanlegg i Canada, USA, Chile, Scotland og Færøyene.



**Figur 1.3** Oversikt over antall ILA-utbrudd i Norge frem til 2004. Figuren er hentet fra (Vitenskapskomiteen, 2007).

Vanligvis kommer virus inn i fisken via gjellene, men det kan ikke utelukkes at det også kan komme inn oralt. De viktigste målcellene er endotelceller som kler innsiden av pratisk talt alle blodkar og hjertet. Viruset har i tillegg blitt påvist i andre celletyper, inkludert polymorfe leukocytter.

ILAV forårsaker en fatal systemisk infeksjon i atlantisk oppdrettslaks og en asymptomatisk infeksjon i villfisk (det er vanskelig å finne død villfisk). Viruset kan i tillegg infisere og replikere i sjøørret, brunørret, regnbueørret, ål, sild og arktisk røye, noe som resulterer i asymptomatiske og sannsynligvis livslange bærere av viruset. Slike benigne infeksjoner i villfisk er sannsynligvis kilden til virulente stammer som forårsaker klinisk sykdom i atlantisk oppdrettslaks (Rimstad og Mjaaland, 2002).

Før 1995 var det ikke mulig å isolere samt dyrke ILAV *in vitro* på grunn av mangel på en passende cellelinje. I 1995 ble det etablert en ny cellelinje, SHK-1, fra hodenyre-leukocytter i atlantisk laks (Dannevig *et al.*, 1995). Denne cellelinjen var egnet for replikasjon av ILAV med utvikling av cytopatiske effekter (CPE). Senere har også andre cellelinjer, for eksempel ASK-cellelinjen, som støtter replikasjon av ILAV og utvikling av cytopatiske effekter blitt utviklet (Rolland *et al.*, 2005).

---

### 1.2.2 Genom og struktur

ILAV har en rekke morfologiske, biokjemiske og fysiokjemiske egenskaper til felles med influensavirusene. Det er den eneste arten i genus *isavirus*, som er en av de fem generaene i familien *Orthomyxoviridae*. Virus som tilhører genus *isavirus* er membrankledte partikler med en diameter på 90-140 nm. På overflaten har de 13-15 nm lange utstikkere som består av hemagglutinin-esterase (HE) som er et kompleks av reseptorbindende hemagglutinin og et reseptorødeleggende enzym, esterase (Kibenge *et al.*, 2004). I tillegg har de også et viralt membran-fusjonsprotein (F) (Aspehaug *et al.*, 2005).

Slik som for influensavirus, består også genomet til ILAV av åtte segmenter av lineært, enkelttådet, negativ RNA som koder for minst 10 proteiner. Segmentene, som alle er sekvensert, har en lengde som varierer fra 1 til 2,4 kb, med en samlet molekylstørrelse på ca. 14,3 kb (Kibenge *et al.*, 2004).

Nukleotid- og aminosyresekvenser fra ILAV viser liten eller ingen homologi med andre orthomyxovirus, og i tillegg er også størrelsen og organiseringen av genene helt unik (Garcia-Rosado *et al.*, 2008).

**Tabell 1.1 Sammenligning av genomkodende proteiner fra ILAV og influensavirus type A**

Genomsegment	Genprodukt	
	ILAV	Influensavirus type A
1	PB2 (84 kDa) <sup>2</sup>	PB1 (96 kDa)
2	PB1 (84 kDa)	PB2 (87 kDa)
3	NP (77 kDa)	PA (85 kDa)
4	PA (71 kDa)	HA <sub>1</sub> (48 kDa), HA <sub>2</sub> (29 kDa)
5	gp50 (47 kDa)	NP (50–60 kDa)
6	HE (42 kDa)	NA (48–63 kDa)
7	p32 (32 kDa), NEP (18 kDa), p11 (11 kDa)	M1 (25 kDa), M2 (15 kDa)
8	M1 (24 kDa), NS1 (16 kDa)	NS1 (25 kDa), NS2 (12 kDa)
<sup>1</sup> Genprodukt: PB2, PB1 and PA, polymerase; NP, nukleoprotein; HA, hemagglutinin (to subenheter i influensavirus A); gp50, et kappeprotein med ukjent funksjon i ILAV ( <a href="#">Falk et al., 2004</a> ); HE, hemagglutinin-esterase ILAV ( <a href="#">Falk et al., 2004</a> ); NA, neuraminidase; M1, matriks protein ( <a href="#">Falk et al., 2004</a> ); p32, et strukturelt protein med ukjent funksjon i ILAV; M2, ionekanalprotein; p11, protein med ukjent status and funksjon i ILAV; NS1, ikke-strukturelt protein 1; NS2, ikke-strukturelt protein 2 (også kjent som kjerne-eksport protein, NEP).		
<sup>2</sup> Nummer i parentes er den observerte molekylvekten til det korresponderende virale proteinet.		

Figuren er hentet fra (Kibenge et al., 2004).

- Segment 1 i ILAV koder for et stort kjerneprotein som sannsynligvis har en analog funksjon til PB2-proteinet til influensavirus (Snow et al., 2003).
- Segment 2 koder for et polymeraseprotein (PB1) (Ritchie et al., 2001).
- Segment 3 koder for et viralt nukleoprotein (NP) (Aspehaug et al., 2004).
- Segment 4 koder for en polymerase (PA) (Ritchie et al., 2001).
- Segment 5 koder for et glykoprotein som er et type 1 membran-fusjonsprotein (F) (Aspehaug et al., 2005).
- Segment 6 koder for et hemagglutinin-esterase (HE) protein (Falk et al., 2004).

- 
- Segment 7 koder for 3 proteiner med en estimert molekylstørrelse på 32, 28 og 9,5 kDa (Kibenge *et al.*, 2007). Produktet til det primære transkriptet (7-ORF1) er sannsynligvis et ikke-strukturelt protein (NS1) som inhiberer type I-interferonresponsen (Garcia-Rosado *et al.*, 2008). 18 kDa-proteinet er et kjerne-eksport protein (NEP), mens funksjonen til 9,5 kDa-proteinet på dette tidspunktet er ukjent (Kibenge *et al.*, 2007).
  - Segment 8 inneholder to overlappende leserammer (ORF). Den minste ORF1 koder for et matriksprotein (M) (Biering *et al.*, 2002), mens den større ORF2 sannsynligvis koder for et interferon-antagonist protein (Garcia-Rosado *et al.*, 2008).

### 1.2.3 Genetisk variasjon hos ILAV

De virale genene assosiert med influensavirusets patogenisitet kan variere avhengig av virusstamme og vert. Overflateglykoproteiner har en viktig rolle i virus-binding og -frigjøring noe som tilsier at de også har en viktig rolle i virulens (Mjaaland *et al.*, 2005). Både HA- og NA-genene til influensavirus type A er veldig variable, noe som gir grunnlag for å dele virusene i subtyper (Neumann og Kawaoka, 2007).

Nylig har også HE kodet av segment 6 i ILAV blitt identifisert og beskrevet. Segment 6 er det segmentet med størst variabilitet i ILAV-genomet. Sammenlignet med influensavirus, så er variabiliteten i HE unik, ettersom den er konsentrert til et hypervariabelt område (HPR) som er karakterisert av delesjoner (Mjaaland *et al.*, 2002). Den lengste varianten av det hypervariabelt området er muligens en tidlig, avirulent variant. Denne genotypen, HPR0, har senere blitt funnet i både vill- og oppdrettslaks, og det har fremdeles ikke vært mulig å assosiere sykdom til denne genotypen. Alle sykdomsassosierte isolat som er karakterisert har en form for delesjonsmønster i HPR, noe som tyder på at delesjoner i denne regionen er nødvendig for å utvikle sykdom i fisk. Europeiske ILAV-isolat kan videre genotypes i ulike grupper på bakgrunn av delesjonsmønster i HPR, hvor de fleste sekvenser som tilhører en gitt HPR-gruppe stammer fra utbrudd med liknende sykdomsutvikling. Isolatene kan i tillegg grupperes i forhold til om de induserer en akutt eller kronisk infeksjon. ILAV 2, ILAV 4, og ILAV 7 forårsaker alle en akutt sykdom, mens ILAV 10 gir et kronisk sykdomsforløp. Videre tilhører ILAV 4 og ILAV 7 den samme HPR-gruppen, noe som vil si at de har samme delesjonsmønster i HPR. Til tross for dette har de ulik patogenisitet. ILAV 2 er det



---

mest patogene av de fire isolatene, basert på at det gir høyest mortalitet (29,1 %). ILAV 4 er også et høypatogent isolat (mortalitet på 17,7 %), mens ILAV 7 og ILAV 10 er lavpatogene isolat med en mortalitet på henholdsvis 2,5 % og 5,1 % (Mjaaland *et al.*, 2005).

## 1.3 Interferonresponsen ved en virusinfeksjon

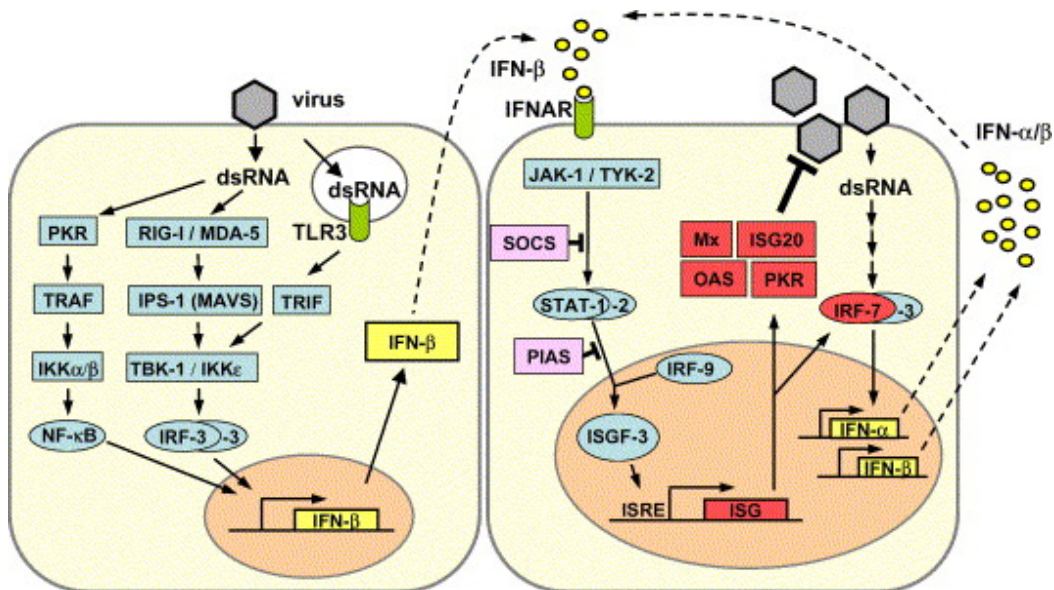
Normalt sett er både fisk og pattedyr relativt motstandsdyktige mot virus fordi det medfødte immunforsvaret stopper de fleste virusinfeksjoner i en tidlig fase. Et hovedelement i det medfødte forsvaret mot virus er interferonsystemet, og senere års forskning har vist at fisk har et interferonsystem som ligner ganske mye på det man finner hos pattedyr (Robertsen, 2006).

Interferoner tilhører en gruppe viktige regulatoriske proteiner som kalles cytokiner.

Interferoner deles i to hovedgrupper, type I- og type II-interferoner, som kan skilles på bakgrunn av forskjeller i gensekvens, proteinstruktur og funksjonelle egenskaper (Samuel, 2001), (Pestka *et al.*, 2004) og (Kontsek *et al.*, 2003). Type I-interferoner inkluderer INF- $\alpha/\beta$  som induseres av virus i de fleste celletyper, mens type II-interferon, IFN $\gamma$ , produseres av NK-celler og T-lymfocytter i respons til IL-12, IL-18, mitogener og antigener (Samuel, 2001) og (Okamura *et al.*, 1998).

### 1.3.1 Aktivering av interferonsystemet

I de fleste mammalske celler aktiveres IFN-systemet ved gjenkjennelse av viralt dsRNA via intracellulære reseptorer som inkluderer de to RNA-helikasene RIG-1 og MDA-5, i tillegg til toll-liknende reseptor 3 (TLR3) i endosomet. Ligandbinding vil aktivere en signalkaskade som ender med aktivering av transkripsjonsfaktorene interferon responsfaktor-3 (IRF-3), nukleær faktor kappa B (NF $\kappa$ B) og AP-1. IRF-3 vil videre translokere fra cytosol til kjernen hvor det initierer transkripsjon av IFN- $\beta$ . Sekret IFN- $\beta$  kan bindes til type I-interferonreseptor på infiserte/ uinfiserte celler og indusere ekspresjon av en rekke interferonstimulerte gener (ISG) via JAK/ STAT-signalveien. Interferon responsfaktor-7 (IRF-7) vil også bli aktivert via JAK/ STAT-signalveien, noe som fører til transkripsjon av IFN- $\alpha$  som i likhet med IFN- $\beta$  kan binde til type I-interferonreseptor og indusere ekspresjon av ISGer og interferoner (Haller *et al.*, 2006).



**Figur 1.4 Type 1 interferon-induksjon, -signalering og -effekter.** Se tekst for detaljer. Figuren er hentet fra (Haller *et al.*, 2006).

Binding av IFN- $\alpha/\beta$  til spesifikke overflatereseptorer vil aktivere transkripsjonen av flere hundre ulike interferonstimulerte gener. Noen av disse koder for antivirale proteiner som for eksempel MX, PKR og ISG-15.

Interferonstimulert gen-15 (ISG-15) er et av de tidligste og mest prominente genene som induseres i pattedyr i respons til IFN- $\alpha/\beta$ , noe som tilsier at det kan ha en viktig rolle i interferonsystemet. Funksjonen til ISG-15 er fremdeles ikke helt klarlagt, men i likhet med ubiquitin, har studier i både pattedyr og fisk vist at proteinet konjugeres til cellulære proteiner. Dette kan være en mekanisme som er ansvarlig for proteinets antivirale aktivitet. Studier har i tillegg vist at ISG-15 kan stimulere proliferasjon av NK-celler samt inducere leukocyt-cytotoksitet i nærvær av T-celler (Ritchie og Zhang, 2004). Den humane utgaven av MX proteinet har vist seg å ha antiviral aktivitet mot en rekke virus, inkludert influensavirus (Haller *et al.*, 1998), mens MX proteinet fra atlantisk laks har en antiviral aktivitet mot infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) (Larsen *et al.*, 2004). Den antivirale mekanismen til MX proteinet er ikke kjent, men en hypotese er at proteinet interfererer med viral replikasjon ved å forhindre intracellulær transport av virale nukleokapsider (Kileng *et al.*, 2007). Et annet sentralt antiviralt protein er protein kinase R (PKR), som er en dobbelttrådet RNA-avhengig protein kinase. Et av substratene til PKR er eukaryot initieringsfaktor-2 (EIF-2), og fosforylering av EIF-2 resulterer i inhibering av både cellulær- og viral mRNA-translasjon, noe som effektivt hindrer virusreplikasjon (Garcia *et*

---

*al.*, 2007). En studie utført av Kileng *et al.* (2007) viser at ISG-15 og MX induseres før interferon i celler infisert med ILAV, noe som kan tyde på at disse proteinene også induseres via en interferon-uavhengig mekanisme (for eksempel av ssRNA eller virale proteiner) (Kileng *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Virale interferon-antagonist proteiner

En rekke virusgenomer koder for proteiner som hemmer den cellulære interferonmedierte antivirale responsen. Dette understreker hvor viktig interferonsystemet er i vertsforsvaret mot virale infeksjoner. Orthomyxovirus kan hemme interferonsystemet via flere mekanismer som inkluderer inhibering av IFN- $\beta$ -induksjon og aktiviteten til PKR (Kochs *et al.*, 2007) og (Min og Krug, 2006). Det finnes lite informasjon om ILAV og interferon-antagonisme, men studier indikerer at ILAV motvirker den antivirale responsen. Bakgrunnen er at viral replikasjon av ILAV kun blir lett redusert i lakseceller som på forhånd er behandlet med poly I:C (syntetisk dobbelttrådet RNA) som igjen inducerer IFN- $\alpha/\beta$  (type 1-IFN) (Jensen *et al.*, 2002). I de samme cellene oppnås tilnærmet total blokkering av replikasjon for IPNV (infeksiøs pankreas nekrose virus) (Robertsen *et al.*, 2003). I tillegg forsinkes ILAV induksjon av type 1-IFN i infiserte celler (Kileng *et al.*, 2007). En nyere studie utført av Garcia-Rosado *et al.* (2008) viser at ILAV-genomet koder for to interferon-antagonist proteiner, s7ORF1 proteinet (segment 7) og s8ORF2 proteinet (segment 8). Resultatene indikerer at begge proteinene hemmer den cellulære type 1-interferonresponsen ved å nedregulere type 1-IFN promotor aktivitet, samt at det er s7ORF1 proteinet som har den kraftigste effekten. s7ORF1 proteinet er lokalisert i cytoplasma og mangler RNA-bindende egenskaper, noe som tilsier at det kan inhibere aktivering av IFN-promotor ved å interagere med signalproteiner i cytoplasma. s8ORF2 proteinet derimot, inhiberer muligens viral induksjon av IFN ved å binde viralt ssRNA og dsRNA-intermediater. Binding av dsRNA kan i tillegg inhibere viral aktivering av PKR (Garcia-Rosado *et al.*, 2008).

## 1.4 Apoptose

Celledød kan inntreffe på to hovedmåter: nekrose og apoptose. Nekrose er en passiv, katabolsk, patologisk celledødsprosess som vanligvis finner sted som respons på eksterne toksiske faktorer (for eksempel inflammasjon, iskemi eller toksisk skade). Nekrose

---

karakteriseres av svelling av mitokondriene, tidlig skade på plasmamembranen, disperst kromatin og ødeleggelse av cellestrukturen. Apoptose derimot, er en aktiv, metabolsk og genetisk kodet prosess som skjer under fysiologiske eller patologiske forhold. Apoptose kjennetegnes av ”membranutvekster”, kondensert kromatin og aktivering av en endonukleolytisk prosess som fører til kløyving av DNA. Som følge av dette vil cellene krympe og kondensere til flere små membranbundne apoptotiske legemer som videre kan fagocyteres (Wu *et al.*, 2001).

### **1.4.1 Mekanismer for apoptose**

To apoptotiske hovedmekanismer har blitt beskrevet i eukaryote celler: intrinsisk og ekstrinsisk (se figur 1.5).

#### **Den ekstrinsiske signalveien**

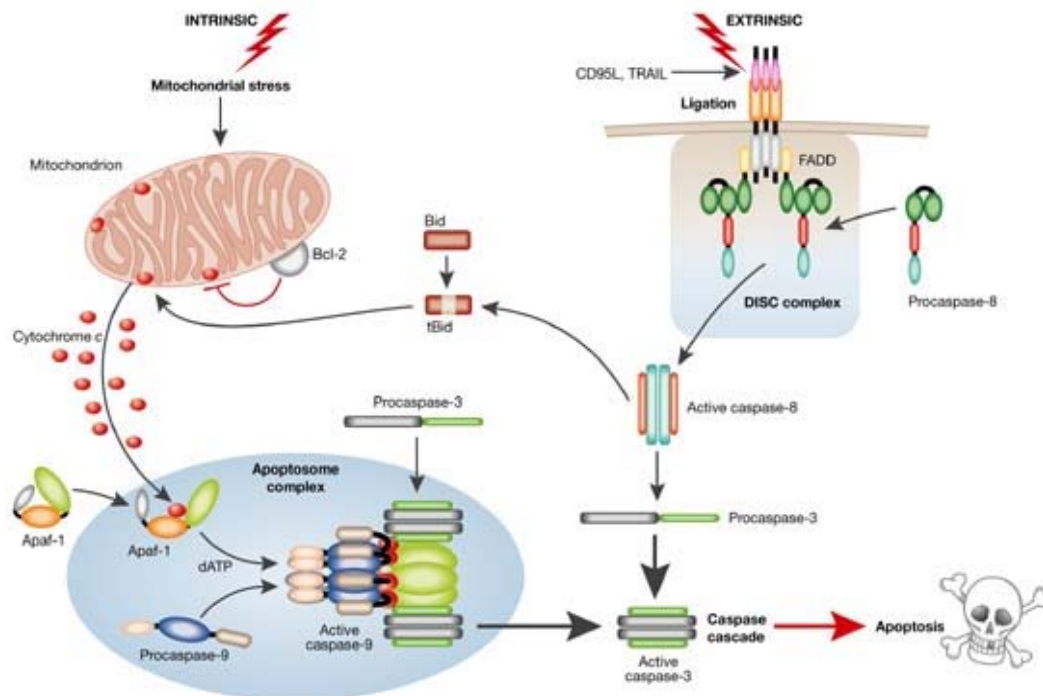
Den ekstrinsiske signalveien medieres av celleoverflatereseptorer slik som Fas, tumor nekrosefaktor-reseptor (TNFr) eller TNF-relatert apoptose-induserende ligand (TRAIL)-reseptorer. Ligandstimulering resulterer i oligomerisering av reseptorene og påfølgende rekruttering av adaptorproteinet fas-assosiert dødsdomene (FADD) og caspase 8 (initieringscaspase). Dette fører til dannelsen av et dødsinduserende signalkompleks (DISC). Autoaktivering av caspase 8 i DISC etterfølges av aktivering av effektor-caspaser (caspase - 3, -6 og -7).

#### **Intrinsiske signalveien**

Den intrinsiske signalveien medieres av en rekke apoptotiske stimuli (stressfaktorer) som påvirker mitokondriene. Slike stressfaktorer inkluderer DNA-skade indusert av stråling eller kjemikalier, mangel på vekstfaktorer eller oksidativt stress. Frigjøring av cytokrom c fra mitokondriene til cytoplasma initierer en caspase-kaskade. Cytosolisk cytokrom c binder til apoptose proteaseaktiverende faktor-1 (apaf-1) og pro-caspase 9. Dette generer et DISC-liknende kompleks kjent som et apoptosom. I apoptosomet blir caspase 9 aktivert, noe som fører til prosessering av caspase 3.

Apoptoseprosessen kontrolleres nøye av et komplekst regulatorisk nettverk. Pro-overlevelsessignaler øker ekspresjonen og/ eller aktiviteten til antiapoptotiske regulator-

molekyler. En rekke ulike antiapoptotiske molekyler og prosesser har blitt identifisert, som for eksempel NF $\kappa$ B, AKT, bcl-2, og IAP-proteiner (Jin og El-Deiry, 2005).



**Figur 1.5 Forenklet oversikt over den ekstrinsiske og intrinsiske apoptoseveien.** Figuren er hentet fra (MacFarlane og Williams, 2004).

### 1.4.2 Influensavirus og apoptose

En viktig cellulær signalrespons som ofte observeres ved virusinfeksjoner, er induksjon av den apoptotiske kaskaden. Apoptose betraktes vanligvis som et vertscelleforsvar fordi mange virus uttrykker antiapoptotiske proteiner som forhindrer denne responsen. Det har lenge vært kjent at influensavirus type A-infeksjoner resulterer i induksjon av apoptose både *in vitro* og *in vivo*, men de faktiske konsekvensene av dette i forhold til virusreplikasjon og vertsforsvar er fremdeles omdiskutert (Ludwig *et al.*, 2006).

Det Fas/ FasL apoptoseinduserende reseptor/ ligand-systemet uttrykkes i forhold til nivået av PKR i infiserte celler, noe som sannsynligvis bidrar til virusindusert celledød via FADD/ caspase 8. Induksjon av apoptose kan også skje via aktivering av TGF- $\beta$ , som er en kjent

---

apoptoseinduserende substans som aktiveres av virale neuraminidaser. Tidligere studier viste at en overekspressjon av det antiapoptotiske proteinet bcl-2 resulterte i redusert virusproduksjon. Videre har det blitt vist at det virale NS1 proteinet har proapoptotiske egenskaper når det uttrykkes ektopisk. Senere studier har vist det motsatte, noe som kan tyde på at NS1 faktisk har antiapoptotiske egenskaper. Denne teorien knytter viral apoptoseinduksjon til den antivirale type I-interferonresponsen, fordi NS1 proteinet er en effektiv IFN- $\alpha$ /  $\beta$ -antagonist. Type I-interferoner, i tillegg til Fas/ FasL-systemet, er de viktigste apoptoseinduserende substansene ved en influensavirus-infeksjon. Caspaser kløyver NP til humane influensavirus-stammer, noe som fører til at NP ikke inkorporeres i nye virions. Videre har det *in vitro* blitt vist at M1 proteinet binder til caspase 8 og svakt til caspase 7, noe som tyder på at M1 interfererer med den caspase 8-medierte apoptoseveien. PB1-f2 induserer apoptose via den mitokondrielle veien ved å danne porer i mitokondriemembranen (Ludwig *et al.*, 2006).

## 1.5 Immunologiske og apoptotiske gener som er analysert

### **Interferon- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ ), interferonstimulert gen-15 (ISG-15) og MX: Se avsnitt 1.3.1.**

#### **Tumor nekrose faktor- $\alpha$ (Tnf- $\alpha$ )**

Tumor nekrose faktorer (TNF) er pleiotropiske cytokiner som er involvert i inflammasjon, apoptose, celleproliferasjon og en generell stimulering av immunsystemet (Savan *et al.*, 2005). TNF- $\alpha$  aktiverer vaskulært endotel og øker vaskulær permeabilitet, noe som i vev fører til økt influks av IgG, komplementkomponenter og celler, samt økt væskedrenering til lymfekjertler (Parham, 2005).

#### **Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

Interleukiner tilhører en gruppe biologisk aktive proteiner som kalles cytokiner. Det er en av de viktigste mediatorene i kroppens respons til mikrobiell invasjon, inflammasjon, immunologiske reaksjoner og vevsskade (Bird *et al.*, 2002).

IL-1 –familien består av blant annet IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$ . IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  har nesten identiske biologiske egenskaper og begge produseres av monocytter, lymfocytter, endotelceller, keratinocytter, mikrogli, megakarocytter, neutrofile, fibroblaster og kondrocytter.

---

Endotoksin (LPS) fra gram-negative bakterier, forbol-ester, kalsium ionoforer og andre cytokiner kan indusere produksjonen av IL-1 $\alpha$  og IL-1 $\beta$  i monocytter.

IL-1 er viktig ved inflammasjon og akutt fase-responsen ved at det øker produksjonen av cytokiner i inflammasjonsområdet. Dette fører til ekspresjon av adhesjonsmolekyler og sekresjon av kjemokiner, noe som resulterer i influks av inflammatoriske celler og en direkte induksjon av akutt fase proteiner i leveren. IL-1 utøver en effekt både på B- og T-celler, og stimulerer dermed T-celle-proliferasjon. IL-1 øker også fibroblastproliferasjon og ekspresjon av matriks-metalloproteinase (Meager og Wadhwa, 2007).

### **Opiod vekstfaktor-reseptor (OGFr)**

Opioide peptider fungerer som vekstfaktorer i nevronale og ikke-nevronale celler og vev. I tillegg er de involvert i nevrotransmisjon/ nevromodulering i nervesystemet (Zagon *et al.*, 2002). Det endogene opioide peptidet, (Met5)-enkefalin, også kalt opioid vekstfaktor (OGF), er et konstituttivt uttrykt opioid som interagerer med OGF-reseptoren (OGFr) og inhiberer cellereplikasjon og -vekst under neoplasi, utvikling, sårtilheling og angiogenese.

Subcellulære fraksjonsstudier viser at OGF-reseptoren er et integrert membranprotein som er assosiert med kjernen (Zagon *et al.*, 2007).

En studie på atlantisk laks utført av Matejusova *et al.* (2006) viste at reseptormedierte effekter av OGF kan være involvert i reduksjon av antall mucusceller under kraftige kroniske infeksjoner med parasitten *Gyrodactylus salaris*, via undertrykking av DNA-syntese og redusert basalcelleproliferasjon (Matejusova *et al.*, 2006).

### **Heat shock protein 70 og 90 (Hsp70 og Hsp 90)**

Ekspresjonen av stress eller heat shock proteiner (HSP) induseres i respons til en rekke fysiologiske og miljømessige hendelser. I cytosol har disse proteinene en essensiell rolle som molekylære chaperoner ved at de bidrar til rett folding av nylagede og stressakkumulerte misfoldede proteiner, forhindrer proteinaggregering, støtter proteintransport og fremmer antigenprosessering og presentering. Ved stress vil intracellulære HSPer ha en beskyttende funksjon og dermed forhindre letal skade. I motsetning vil membranbundne eller ekstracellulære HSPer fungere som et faresignal og frembringe immunresponser mediert av det adaptive eller medfødte immunforsvaret. Her

---

induserer HSPer cytokinfrigjøring, danner gjenkjennelsesseter for naturlige dreperceller (NK-celler) eller fungerer som bærere av immunogene peptider (Multhoff, 2007).

Humane celler inneholder flere medlemmer av Hsp 70-familien som alle har felles strukturelle og funksjonelle egenskaper, men som induseres av ulike former for stress. Hsp 70 fungerer i likhet med andre HSP-proteiner som et molekylært chaperon. I tillegg kan proteinet forhindre apoptose ved å interferere med signalkaskader og inhibere aktivering av effektor-caspaser (Pirkkala og Sistonen, 2006).

Heat shock protein 90 (Hsp 90) er et annet cellulært chaperon som tilhører HSP-familien. Proteinets har en "husholdningsfunksjon" i cellen som bidrar til folding, aktivering og sammensetning av en rekke proteiner slik som transkripsjonsfaktorer, steroidreseptorer og protein kinaser. Dette er substrater som er involvert i regulering av cellesyklus og signaloverføring. Hsp 90 er sannsynligvis også involvert i sammensetning og kjernetransport av influensavirus RNA polymerase-subenheter. I uinfiserte celler er Hsp 90 stort sett lokalisert i cytoplasma. Under en virusinfeksjon vil Hsp 90 interagere med de virale polymerasesubenheterne PB1 og PB2. Dette fører til dannelsen av et PB1-PB2-Hsp 90-kompleks samt et PB2-Hsp 90-kompleks som videre transporteres inn i kjernen, hvor Hsp 90 frigjøres (Naito *et al.*, 2007).

### **Cyclooxygenase-2 (COX-2)**

Cyclooxygenase (COX) er et enzym som katalyserer oksidasjon av arakidonsyre til prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) som er en forløper til prostanoider. Det finnes tre kjente isoformer av COX. COX-2 uttrykkes i hjernen, nyrer og testikler i tillegg til at ekspresjonen induseres hurtig i de fleste celletyper i respons til proinflammatoriske eller mitogene aktivatorer, inkludert cytokiner, endotoksin, tumor promotorer og inflammatoriske molekyler. Den økte ekspresjonen av COX-2 fører til produksjon av hyperalgesiske og proinflammatoriske prostaglandiner på inflammasjonsstedet (Steer og Corbett, 2003). Effektene av prostaglandiner i den inflammatoriske responsen inkluderer vasodilasjon og økt vaskulær permeabilitet via en interaksjon med histamin og bradykinin, nedregulering av leukocyttfunksjon, lymfocyt-proliferasjon og antistoffproduksjon. Mangel på COX-2 resulterer i redusert inflammasjon og proinflammatorisk cytokinfrisetting, redusert morbiditet, og til tross for høye virustiter, økt overlevelse etter en influensavirus type A infeksjon (Carey *et al.*, 2005).



---

## p38

Mitogen-aktiverte protein kinaser (MAPKer) består av fire subfamilier: ekstracellulære signalregulerte kinaser (ERKer), ERK5, JUN N-terminal kinaser (JKNer) og p38 kinaser. Den enzymatiske aktiviteten til MAPKer påvirkes i stor grad av ekstracellulære hendelser. Eksterne stimuli og stressfaktorer som for eksempel osmotisk sjokk, hypoksia, varmesjokk, UV-stråling, LPS, IL-1, TGF- $\beta$  og TNF, initierer en GTPase-avhengig aktivering av flere mitogen-aktiverte protein kinase kinase kinaser (MAPKKKer) som er oppstrøms for p38. Disse kinasene fosforylerer og aktiverer kinasene MAPKK3 (MKK3), MKK4 og MKK6 som igjen fosforylerer p38. Dette øker kinaseaktiviteten og tilgang til substrat. De viktigste konsekvensene av p38-aktivering er økt ekspresjon av mRNA som koder for cytokiner og reseptorer involvert i inflammasjon og immunitet (Ashwell, 2006).

### **Ekstracellulær signalregulert kinase (ERK)**

Ekstracellulær signalregulert kinase (ERK) aktiveres av en rekke stimuli inkludert vekstfaktorer, cytokiner, virusinfeksjon, ligander for G-proteinkoblede reseptorer og karsinogener (Johnson og Lapadat, 2002). Den klassiske aktiveringen av ERK finner sted via en sekvensiell aktivering av Ras G proteiner, Raf kinaser og MAPK/ERK kinase 1 og -2 (MEK1 og -2) som videre fosforylerer og aktiverer ERK1 og -2 (Caunt *et al.*, 2006). Denne kaskaden har en sentral funksjon i induksjon av en rekke prosesser som inkluderer proliferering, differensiering, utvikling, og i visse tilfeller også celleoverlevelse, migrering og apoptose (Shaul og Seger, 2007).

Membranakkumulering av HA fra influensavirus type A, fører til aktivering av Raf/MEK/ERK-signalkaskaden via PKC $\alpha$ , noe som igjen trigger eksport av RNP fra kjernen. Blokkering av denne kaskaden resulterer i redusert eksport av RNP og dermed redusert virusproduksjon (Marjuki *et al.*, 2006).

### **Programmed cell death protein 5 (PDCD5)**

Programmed cell death 5 (PDCD5) proteinet er et relativt nyoppdaget protein som har en funksjon i reguleringen av celleapoptose. En studie utført av Chen *et al.* (2001) viser at nivået av PDCD5 er signifikant høyere i celler som undergår apoptose sammenlignet med normale celler. Ved induksjon av apoptose vil PDCD5 hurtig translokere fra cytoplasma til cellekjernen ved en til nå ukjent mekanisme. Akkumulering av PDCD5 i kjernen skjer før andre typiske apoptotiske hendelser som eksternalisering av fosfatidylserin og fragmentering

---

av kromosomalt DNA. Translokasjon av PDCD5 til kjernen kan derfor være en tidlig apoptosemarkør (Chen *et al.*, 2001).

### **Caspase 3**

Caspasene tilhører en familie cystein-avhengige aspartat-spesifikke proteaser. Caspasene syntetiseres som inaktive zymogener som blir aktivert av en reisverk-mediert transaktivering eller ved kløyving av andre caspaser. Caspase 3 er en effektorcaspase som blant annet kan aktiveres av initiatorcaspase 8 og 9. Aktiverte caspaser kløyver en rekke intracellulære polypeptider, inkludert viktige strukturelle elementer i cytoplasma og kjernen, protein kinaser og komponenter av DNA-reparasjonssystemet. Dette bidrar til de stereotypiske morfologiske og biokjemiske endringene som karakteriserer en apoptotisk celle (Earnshaw *et al.*, 1999).

### **Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)**

IAPer er en gruppe strukturelt relaterte proteiner som opprinnelig ble identifisert i baculovirus. Mammalske IAPer undertrykker apoptose enten ved å binde til og inhibere caspaser eller via en caspaseuavhengig mekanisme (Nachmias *et al.*, 2004). I tillegg til å undertrykke apoptose er IAPer involvert i en rekke andre cellulære funksjoner, inkludert cellesyklus og intracellulær signaloverføring (Deveraux og Reed, 1999).

cIAP1 og cIAP2 kan binde seg til ulike caspaser, men ikke inhibere dem. Til tross for dette kan de likevel beskytte cellene mot apoptotiske stimuli, men den eksakte mekanismen for dette er uklar. En hypotese er at cIAPene har en regulatorisk rolle i signalveiene initiert av TNF-reseptor. En annen forklaring er at cIAPene har en ubiquitin E3 ligase aktivitet (Eckelman og Salvesen, 2006).

### **B-cell lymphoma 2 (bcl-2) protein**

B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-familien består av både pro- og antiapoptotiske proteiner som kan deles inn i tre grupper. En gruppe inhiberer apoptose (bcl-2, BCL-XL, BCL-W, mcl-1, BCL-B og A1), mens en andre gruppe induserer apoptose (BAX, BAK and BOK). Den tredje gruppen (BAD, BIK, BID, HRK, BIM, BMF, NOXA and PUMA) kan induserer apoptose ved å inhibere de antiapoptotiske proteinene i Bcl-2-familien. Det antiapoptotiske proteinet bcl-2 inhiberer de proapoptotiske proteinene BAX og BAK som promoterer caspaseaktivering via deres effekt på mitokondriene (Youle og Strasser, 2008).

---

### **Myeloid cell leukemia-1 (mcl-1) protein**

Myeloid cell leukemia-1 (mcl-1) er et antiapoptotisk protein som tilhører Bcl-2 familien.

Mcl-1 ekspresjon kan induseres av en rekke vekstfaktorer og cytokiner, inkludert IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, granulocyt-makrofag-koloni-stimulerende faktor (MG-CSF), vaskulær endotelcelle vekstfaktor (VEGF) og epidermal vekstfaktor (EGF) (Yang-Yen, 2006).

Mcl-1 proteinet er essensielt for embryogenese og for utvikling og opprettholdelse av både B- og T-celler. I tillegg øker mcl-1 celleoverlevelse. Den eksakte molekylære mekanismen for dette er ikke kjent, men den involverer sannsynligvis inhibering av cytokrom c frigjøring fra mitokondriene. Mcl-1 kan også ha en positiv rolle i apoptose. Caspaser som aktiveres under apoptose kan kløyve mcl-1, noe som gir opphav til et potent celledød-promoterende protein som videre kan aktivere caspaser (Michels *et al.*, 2005).

### **Nukleær faktor kappa B (NFκB)**

Nukleær faktor kappa B (NFκB) er en induserbar transkripsjonsfaktor som har en viktig rolle i medfødt/ adaptiv immunitet, celleoverlevelse og den hepatiske akutt fase responsen (Tian og Brasier, 2003).

NFκB og dens oppstrøms-regulator, IκB kinase, kontrollerer genekspresjonen av mange proinflammatoriske og antivirale cytokiner. Disse faktorene er derfor essensielle komponenter i den medfødte antivirale immunresponsen mot infeksiose patogener. Ved en influensavirusinfeksjon derimot, ser det ut til at NFκB-aktivitet kan være involvert i økt virusreplikasjon. På et molekylært nivå kan dette forklares med at NFκB induserer ekspresjonen av de proapoptotiske faktorene tumor nekrosefaktor-relatert apoptoseinduserende ligand (TRAIL) og FasL, som igjen induserer caspaseaktivering. Aktiverte caspaser påvirker sannsynligvis det aktive kjerne-pore komplekset, noe som videre fører til økt effluks av RNP-komplekser fra kjernen (Ludwig *et al.*, 2006). NFκB virker dermed både proapoptotisk og proviralt ved en influensavirus-infeksjon (Wurzer *et al.*, 2004).

### **Transaldolase 1 (TAL 1)**

Transaldolase (TAL) er et viktig enzym i den reversible, non-oksidative grenen i pentose-fosfatveien (Banki *et al.*, 1996).

---

Metabolisme av glukose via pentose fosfatveien (PPP) har to unike funksjoner: dannelsen av ribose 5-fosfat til syntesen av RNA og DNA, og dannelsen av NADPH til biosyntetiske reaksjoner og nøytralisering av reaktive oksygenintermediater (ROIer) via stabilisering av GSH (Perl, 2007). Dannelsen av ROIer har vist seg å være involvert i visse typer apoptotisk celledød. Overekspresjon av TAL i humane T-cellelinjer resulterer i reduserte NADPH- og glutation (GSH)-nivåer, noe som fører til at cellen blir mer påvirkelig for apoptose induisert av serum-mangel, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nitrogenoksid (NO), TNF- $\alpha$ , Fas-antistoff eller infeksjon med HIV-1. Reduserte nivåer av TAL resulterer i økt GSH-nivå som igjen inhiberer apoptose (Banki *et al.*, 1996).

### **p53**

Tumor suppressor proteinet p53 aktiveres i respons til ulike former for stress (for eksempel DNA-skade, hypoksi eller onkogen-ekspresjon). Aktivert p53 fungerer i hovedsak som en transkripsjonsfaktor som regulerer en rekke målgener. Disse genene induserer apoptose, differensiering, DNA-reparasjon og stans i cellesyklus, mens andre igjen inhiberer angiogenese og metastase (Das *et al.*, 2008). I tillegg til å fungere som en transkripsjonsfaktor i kjernen, har p53 også en ekstranukleær funksjon. Proteinene binder direkte til antiapoptotiske proteiner i Bcl-2-familien (for eksempel bcl-2) og aktiverer proapoptotiske Bcl-2 proteiner (BAX og BAK) (Chipuk og Green, 2006).

Nivået og aktiviteten til p53 er oppregulert ved en influensavirus-infeksjon. En studie utført av Turpin *et al.* (2005) viste at p53 er nødvendig for influensavirus-indusert celledød, og at inhibering av p53 fører til økte virale titer. Redusert p53-aktivitet forhindret også interferon-aktivering *in vitro*, noe som tyder på at økte virustiter kan være et direkte resultat av en redusert interferonrespons (Turpin *et al.*, 2005).

### **p62**

p62 er et ubiquitin-bindende protein med en delvis ukjent funksjon og en bred vevsfordeling. Proteinene kan binde non-kovalent til ubiquitin og en rekke signalmolekyler, og kan derfor ha en regulatorisk funksjon knyttet til ubiquitin-systemet (Kusisto *et al.*, 2001). I tillegg fungerer p62 som en "scaffold" for selektiv aktivering av transkripsjonsfaktoren NF $\kappa$ B (Geetha og Wooten, 2002).

---

## **Fourteen Kilodalton Interacting Protein 2 (FIP-2)**

FIP-2 ble første gang beskrevet i forbindelse med dets interaksjon med det adenovirale 14,7 kDa proteinet E3, som inhiberer TNF- $\alpha$ -indusert apoptose (Li *et al.*, 1998). Binding til E3 ser ut til å forhindre inhiberingen og reversere det virale proteinets antiapoptotiske effekt. FIP-2 kan altså øke eller regulere apoptose ved å binde antiapoptotiske proteiner, og i tillegg kan proteinet også ha en funksjon i signaloverføring, vesikkeltransport og cellemorfogenese. Transkripsjon av FIP-2 induseres av interferon- $\alpha$ /- $\beta$ /- $\gamma$  i tillegg til TNF- $\alpha$ .

Nylig har et FIP-2 liknende gen blitt identifisert i atlantisk laks, hvor det ble funnet oppregulert ved infeksjon med parasitten *Gyrodactylus salaris* (Collins *et al.*, 2007).

## **Galektin-9**

Galektiner er en familie av animalske lektiner med affinitet for  $\beta$ -galatosidaser. Funksjonelle studier har vist at galektiner er involvert i en rekke biologiske funksjoner slik som celle-aggregering og -adhesjon, proliferering, celledød og modulering av inflammasjon.

Galektin-9 er en ligand til T-celle immunoglobulin- og mucindomene-inneholdende molekyler 3 (TIM-3) som uttrykkes selektivt på differensierte T<sub>H</sub>1-celler (Zhu *et al.*, 2005). Galektin-9 binder til TIM-3 og induserer apoptose av aktiverte T<sub>H</sub>1-celler via kalsium-influks-caspase 1-veien. (Hirashima *et al.*, 2004).

Ekspresjon av galektin-9 i astrocytter kan induseres av IL-1 $\beta$ , mens IFN- $\gamma$  oppregulerer ekspresjonen av galektin-9 i endotelceller og fibroblaster. Dette gir opphav til et interessant funn hvor IFN- $\gamma$  som induserer vevsinflammasjon, også induserer en inhibitorisk ligand (galektin-9) som reduserer antall T<sub>H</sub>1-celler og dermed forhindrer en kronisk inflammasjon i målorganer (Zhu *et al.*, 2005).

---

## 1.6 Mål for oppgaven

Målet med denne oppgaven var å undersøke om det er forskjeller mellom ILAV-isolatenes evne til å aktivere noen av de medfødte cellulære immunresponser som kan bidra til å gi en forklaring på den ulike patogenisiteten som observeres *in vivo*. Tre dager etter at cellene ble infisert med ILAV, ble ekspresjon av et utvalg gener analysert og fosforyleringsmønsteret til utvalgte signalproteiner studert. Vi ønsket å undersøke følgende problemstillinger:

- Er det en forskjell mellom de fire ILAV-isolatenes evne til å infisere ASK celler *in vitro*? Dette ble studert ved å immunfarge infiserte celler med et ILAV-spesifikt antistoff.
- Er det forskjeller mellom de fire ILAV-isolatenes evne til å indusere genekspresjon av utvalgte stressresponsgener i ASK-celler *in vitro* som kan bidra til en forklaring på forskjeller i patogenisitet *in vivo*? Dette ble undersøkt ved hjelp av kvantitativ PCR ekspresjonsanalyse av et utvalg av gener som i tidligere studier har vist endringer ved stressresponser i laks.
- Er det forskjeller i proteinekspresjon og fosforyleringsstatus av viktige stressrespons- og signalproteiner etter infeksjon med forskjellige ILAV-isolat? Dette ble undersøkt ved westernblotting av et utvalg proteiner som det fantes tilgjengelige antistoffer mot.

En bedre forståelse av patogenisiteten til ILAV vil kunne gi et bedre grunnlag for å utvikle effektive vaksiner mot viruset.

---

## 2. MATERIALER

### 2.1 Kjemikalier og biologiske produkter

Produkt	Leverandør
2-merkaptoetanol	Sigma Chemical St.Louis, USA og Invitrogen USA
10x TG	Bio-Rad Laboratories USA
10x TGS	Bio-Rad Laboratories
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs Ipswich, England
Aceton	Merck Darmstadt, Tyskland
Acrylamid 30 % BIS solution	Bio-Rad California, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
APS (Ammonium persulfat)	Sigma-Aldrich
BSA (Bovint serumalbumin)	Sigma-Aldrich
Buffer for DyNAzyme DNA Polymerase	Finnzymes Espoo, Finland
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
dNTP mix (med dTTP)	Applied Biosystems

	Foster City, USA
DyNAzyme II DNA Polymerase	Finnzymes
ECL plus western blotting detection system	Amersham biosciences Buckinghamshire, England
EDTA	M & B Laboratory Chemicals England
Etanol (96 %)	Arcus Kjemi AS Norge
Etidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ficoll	Sigma-Aldrich
Føtalt kalveserum	GIBCO BRL Uxbridge, England
Gentamicin-sulfat	BioWhittaker™ Maryland, USA
HCl	Merck
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Iseddik	Merck
KCl	Koch-Light Laboratories Ltd. Colnbrook Bucks, England
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Ferak Berlin, Tyskland
Laemmli prøvebuffer	BioRad
Leibovitz L-15 medium	BioWhittaker™
L-glutamin	Sigma-Aldrich
Metanol	VWR International Poole, England



NaCl	Mallinckrodt Baker B.V. Deventer, Nederland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Merck
Natriumdesoxycholat	Merck
Orange G	Merck
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Ponceaus solution	Sigma-Aldrich
Precision Plus Protein Dual Color Standards	BioRad Laboratories
ProLong <sup>®</sup> Gold med DAPI	Invitrogen
SeaKem <sup>®</sup> LE Agarose	Cambrex Bio Science Rockland, Inc. USA
TEMED (N,N,N,N,-tetrametyl-etylendiamin)	Sigma-Aldrich
Tris	MP Biomedicals Ohio, USA
Trizma <sup>®</sup> Base	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA 0,5 %	Invitrogen
Tween 20	Calbriochem, Merck Germany
Tørrmelk	Normilk AS Levanger, Norge
Vann, Molecular Biology Grade	5PRIM Gmbh Hamburg, Tyskland
X-gal	Sigma-Aldrich

---

## 2.2 Løsninger

**Tabell 2.1 Medier til celledyrkning**

Medium	Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon
10 % Leibovitz L-15 medium (komplett L-15 medium)	Leibovitz L-15 medium	500 ml	
	Føtalt kalveserum	50 ml	10 %
	L-glutamin	10 ml	4 mM
	Gentamicin-sulfat (50 mg/ ml)	500 µl	50 µg/ ml
	2-merkapttoetanol	400 µl	40 µM
Serumfritt L-15 medium	Leibovitz L-15 medium	500 ml	
	L-glutamin	10 ml	4 mM
	Gentamicin-sulfat (50 mg/ ml)	500 µl	50 µg/ ml
	2-merkapttoetanol	400 µl	40 µM

**Tabell 2.2 Fosfat-bufret saltvann (PBS) pH 7,4 (4 l)**

Innholdsstoffer	Mengde
NaCl	32 g
KCl	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,08 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	7,12 g
MQ-vann	3950 ml
HCl	pH justeres til 7,4

---

**Tabell 2.3 Tris-EDTA (TE) pH 7,6 (for oppløsning av primere)**

<b>Innholdsstoffer</b>	<b>Mengde</b>	<b>Sluttkonsentrasjon</b>
1 M Tris pH 7,5	1 ml	10 mM
0,5 M EDTA pH 8,0	0,2 ml	1 mM
MQ-vann	8,8 ml	

**Tabell 2.4 RIPA buffer**

<b>Innholdsstoffer</b>	<b>Mengde</b>
PBS	10,0 ml
Igepal	100 µl
Natrium deoxycholate	50 mg
SDS (20 %)	50 µl
Løsning med 10x Complete og 10x PhosSTOP i PBS	700 µl tilsettes 6,3 ml av løsningen over

**Tabell 2.5 Løsninger til westernblotting**

<b>Løsninger</b>	<b>Innholdsstoffer</b>	<b>Mengde</b>
Nedre gelbuffer	Trizma <sup>®</sup> Base SDS (20 %) MQ-vann Justeres til pH 8,8 med HCl/ NaOH	18,170 g 2,0 ml ad 100 ml
Øvre gelbuffer	Trizma <sup>®</sup> Base SDS (20 %) MQ-vann Justeres til pH 6,8 med HCl/ NaOH	6,06 g 2,0 ml ad 100 ml
Polyakrylamid gel (10 %)	MQ-vann Nedre gelbuffer Akrylamid (30 %) TEMED APS (10 %)	1,5 ml 0,9 ml 1,2 ml 1,8 µl 18,0 µl
Polyakrylamid stacking gel	MQ-vann Øvre gelbuffer Akrylamid (30 %) TEMED APS (10 %)	1,2 ml 0,5 ml 0,3 ml 2,0 µl 10,0 µl
Elektroforesebuffer	10x TGS MQ-vann	100 ml 900 ml
Blottebuffer	10x TG Metanol MQ-vann	100 ml 200 ml 700 ml

---

**Tabell 2.6 Løsninger til agarose gelelektroforese**

<b>Løsninger</b>	<b>Innholdsstoffer</b>	<b>Mengde</b>
50x Tris-Acetate (TAE)-buffer	1 M Tris pH 7,5	24,2 g
	0,5 M EDTA pH 8,0	10,0 ml
	Iseddik	5,71 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
OrangeMix	Ficoll	10,0 g
	Orange G	0,125 g
	0,5 M EDTA	2,0 ml
	MQ-vann	38,0 ml

---

## 2.3 Kit

- BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA)
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)
- LightCycler® 480 DNA SYBR Green Master (Roche, Sveits)
- RNeasy free DNase set (Qiagen, USA)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA)
- TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA)

## 2.4 Celler og virus

- ASK (Atlantic salmon kidney ) -celler: Gave fra B. Krossoy, Institutt for fiskeri og marinbiologi, Universitetet i Bergen, Norge
- ILAV isolat 2, 4, 7 og 10: Gave fra B. Krossoy, Institutt for fiskeri og marinbiologi, Universitetet i Bergen, Norge

---

## 2.5 Antistoffer

**Tabell 2.7 Antistoffer brukt ved westernblotting**

<b>Primær-antistoff</b>	<b>Fortynning</b>	<b>Sekundær-antistoff</b>	<b>Fortynning</b>
Tubulin (12G10)	1:500	Geit anti-mus HRP	1:10 000
ILAV-HE, 6AD9Z	1:1000	Geit anti-kanin HRP	1:10 000
Hsp 70	1:1000	Geit anti-mus HRP	1:10 000
Galektin-9	1:500	Esel anti-geit HRP	1:10 000
ERK1 (fosforylert)	1:1000	Geit anti-kanin HRP	1:10 000
p38	1:1000	Geit anti-kanin HRP	1:2000
p38 (fosforylert)	1:1000	Geit anti-kanin HRP	1:2000

### **Leverandører:**

Tubulin (12G10) (monoklonalt): Frankel og Nelsen, Avdeling for biovitenskap, Universitetet i Iowa, USA

ILAV-HE, 6AD9Z (polyklonalt): Gave fra B.Krossoy, Institutt for fiskeri og marinbiologi, Universitetet i Bergen, Norge

Hsp 70 (monoklonalt): Abcam plc., Cambridge, UK

Galektin-9 (polyklonalt): Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, USA

Fosforylert ERK1 (polyklonalt): Abcam plc., Cambridge, UK

p38 (polyklonalt): Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, USA

Fosforylert p38 (monoklonalt): Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, USA

Geit anti-mus HRP, Geit anti-kanin HRP og Esel anti-geit HRP: Jackson

## 2.6 Primerliste

**Tabell 2.8 Primere benyttet ved sanntids revers-transkriptase PCR (sanntids RT-PCR).** Primere mot NFκB og HE ble designet og testet for bruk i denne oppgaven. De resterende primerne var allerede designet og testet. \*E-verdi = primer-effektivitet

\*\*Amplikonstørrelse

Gen	Retn.	Sekvens	E*	Str.**	Acc.nr.
<b>18S</b>	F	TGTCCGCTAGAGGTGAAATT	2,00	61	AJ427629
	R	GCAAATGCTTTCGCTTTCG			
<b>EF1-α</b>	F	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA	1,97	77	AF321836
	R	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC			
<b>IFN-α</b>	F	CCTGCCATGAAACCTGAGAAGA	2,00	107	AY216594
	R	TTTCCTGATGAGCTCCCATGC			
<b>ISG-15</b>	F	TGTTAGGTGTCAATGGGAGCAA	2,03	151	AY926456
	R	TGTGTCTGGCCCTTTTCGTT			
<b>MX</b>	F	TGATCGATAAAGTGACTGCATTCA	2,00	80	SSU66477
	R	TGAGACGAACTCCGCTTTTCA			
<b>TNF-α</b>	F	CGGGTTCAAGCTACAAGGGA	2,21	51	DQ787158
	R	AAGAGCCCAGTGTGTGGGAT			
<b>IL-1β</b>	F	GGAGAGGTTAAAGGGTGGCG	2,06	51	AY617117
	R	TCCTTGAACTCGGTTCCCAT			
<b>OGFr</b>	F	GCAAAGCAGAGGCTGGTCAC	2,02	51	AM259613
	R	GCCGTAGAAGTCCAGCATGAG			
<b>Hsp 70</b>	F	AGACAGGCCACTAAGGACGC	1,98	51	AJ632154
	R	TCTCAGCACATTCAGCCCAG			
<b>Hsp 90</b>	F	GAATGACAAGGCGGTGAAGG	1,97	51	AF135117
	R	AGAGCGGTCTCGAAAAGCAG			



<b>COX-2</b>	F	GCGGTTTATTCCGGATCCTC	2,20	51	AY848944
	R	GCGAAGAAGGCGAACATGAG			
<b>PDCD5</b>	F	AACCGACGAAAGGTGATGATGGA	1,98	101	TC29121
	R	CCTGAATCCCTCCCTAAGCC			
<b>Caspase 3</b>	F	GGAATGAGCTTTCGCAATGG	1,91	101	DQ008069
	R	ACAGTCTGGTCATTGGCAACC			
<b>cIAP-1</b>	F	AGAACAGCCCGTTCCTCATG	1,98	101	TC43301
	R	CCGAGCGAAGGTGGAGATAC			
<b>Bcl-2</b>	F	TTGTCAGTTGGTGCTGGAGG	1,93	101	TC29759
	R	CCAAATTGCTTCTGCCGTTT			
<b>Mcl-1</b>	F	TTGACTTGGATGACCGATGC	2,12	51	AM259614
	R	TGGCCACAGAATTGATGACG			
<b>NFκB</b>	F	ATGGCAGAAGAGGAGCCTTACCTACCT	1,90	81	TC55326
	R	AGAGAAATTCAGAGGATCCCATAGTGGA			
<b>Trans-aldolase 1</b>	F	ACCTGCTTACCATTTCCTCC	2,01	100	TC25489
	R	CAAATCACAGGCCTTGGCTT			
<b>p53</b>	F	AAAACCCCCGGCAATAACAA	2,00	151	BG934348
	R	CTAGGACCTGAAAGCAGCAGC			
<b>p62</b>	F	TGATGCCTCATCTGCTGCC	2,04	102	CA375694
	R	CGATACCCAGTGGGCTAAGC			
<b>Fip-2</b>	F	CAGCTGCTCCAGTCCCTGAG	1,99	51	DQ496225
	R	TTGTAGCCTCTCCACCCTCTG			
<b>Galektin-9</b>	F	TTAACCTGCGTTTCAACTCGG	2,16	101	AF483533
	R	TGGACCCCACTGTTCTTCA			
<b>Segment 7</b>	F	GAAATGGACAGAGACGGCGTATCA	2,05	124	AY044132
	R	GCTCAACTCCAGCTCTCTCATTGT			

---

<b>HE</b>	F	CTGGAGTAGAATTGATGCTGCTTCG	-	-	AF220607
	R	CAGACAGGCTCGATGGTGAATT			

---

## 3. METODER

### 3.1 Celledyrkning

ASK (atlantic salmon kidney) -celler ble dyrket i komplett L-15 medium. Cellene ble splittet 1:2,5 annenhver uke og inkubert ved 20°C.

### 3.2 Infisering av ASK-celler med ILAV

$4 \times 10^5$  ASK-celler (passasje 80 – 84) ble sådd ut i 25 cm<sup>2</sup> vevs-kultur flasker. Deretter ble det tilsatt 5 ml komplett L-15 medium og cellene ble satt til inkubering ved 20°C frem til infisering med ILAV.

Etter 48 timer ble mediet overført til et sterilt 50 ml rør og spart på til senere bruk. Cellene ble så vasket 3 ganger med kald PBS pH 7,4. Deretter ble det til de ulike flaskene tilsatt 1 ml ILAV-inokulat (MOI=1) 2, 4, 7, eller 10, fortynnet i serumfritt L-15 medium, mens cellene i kontrollflasken ble mock-infisert med 1 ml serumfritt L-15 medium. Flaskene ble så inkubert i 4 timer ved 15°C på et vippebrett, ”The Belly Button” (Stovall Life Science Greenboro, NC, USA).

Etter 4 timer ble det gamle mediet fortynnet 50:50 med serumfritt medium, og det ble tilsatt 5 ml til hver av flaskene som så ble satt til inkubering ved 15°C.

### 3.3 RNA-isolering

RNeasy-metoden (Qiagen, USA) representerer en etablert teknologi for RNA-isolering. Biologiske prøver blir først lysert og homogenisert i nærvær av en denaturerende buffer som umiddelbart inaktiverer RNaser. Deretter blir prøven applisert på en kolonne med en silika-basert membran som binder RNA. Forurensinger vaskes bort og til sist elueres total RNA i vann.

---

## Prosedyre

Etter 3 dager ble cellene høstet. Mediet ble fjernet og cellene vasket 3 ganger med PBS pH 7,4. Dette reduserer risikoen for at mediet inhiberer lysis-bufferen. Total RNA ble isolert ved hjelp av RNeasy Mini Kit (Qiagen) og behandlet med et RNase-fritt DNase-sett (Qiagen) i henhold til produsentens instruksjoner. DNase-behandlingen ble utført for å fjerne eventuell kontaminering med genomisk DNA. Total RNA ble eluert i 50 µl RNase-fritt vann. Deretter ble RNA kvantifisert ved at den optisk tettheten (OD) ved 260 nm/ 280 nm ble målt i et Beckman DU<sup>®</sup>530 spektrofotometer.

## 3.4 cDNA-syntese

Alle RNA-prøvene ble revers transkribert til cDNA ved hjelp av High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit i henhold til protokollen fra produsenten (Applied Biosystems). 1 µg RNA fra hver av prøvene ble transkribert i et totalvolum på 100 µl.

Reagenser som ble brukt for hver av prøvene:

Reagens	Mengde
10x RT Buffer	10 µl
25x dNTP Mix	4 µl
10x RT Random Primers	10 µl
Multiscribe™ Reverse Transcriptase	5 µl
RNase Inhibitor	5 µl
Nukleasefritt vann	ad 100 µl

cDNA-syntesen ble utført i en Eppendorf MasterCycler ved 25°C i 10 minutter (binding av primer), 37°C i 120 minutter (polymerisering) , 85°C i 5 sekunder (denaturering) og deretter 4°C i maksimalt 60 minutter. Prøvene ble så fryst ved -20°C til senere bruk.

---

## 3.5 Proteinisolering

Det ble benyttet to ulike metoder for å isolere protein fra prøvene. Metode 1 baserer seg på aceton-felling av protein i flow-through fra trinn 5 i RNA-isoleringen (avsnitt 3.3). Fordelen med denne metoden er at samme prøve kan brukes for RNA og proteinisolering. I metode 2 blir protein isolert ved å benytte RIPA-buffer.

- **Metode 1:** Proteinisolering ble utført i henhold til følgende protokoll: "Acetone precipitation of protein from Buffer RLT or Buffer RLT Plus lysates (Qiagen)". Pelleten ble resuspendert i 100 µl MQ-vann.
- **Metode 2:** Cellene ble vasket 3 ganger med PBS pH 7,4. Deretter ble det tilsatt 1 ml RIPA-buffer til hver av celleflaskene (175 cm<sup>2</sup>). Cellene ble skrapet av med en celledraske og celledraspen ble overført til et eppendorfrør. Rørene ble så inkubert ved 4°C i 30 minutter. Deretter ble rørene sentrifugert ved 4°C i 10 minutter ved 13.000 rpm (16.000 × g) i en kjølesentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus instruments). Supernatanten ble videre fortynnet 1:1 med Laemmli buffer (950 µl Laemmli prøvebuffer + 50 µl 2-merkaptoetanol). Prøvene ble oppvarmet ved 95°C i 5 minutter før de ble fryst ved -80°C.

## 3.6 Måling av proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved å benytte BCA Protein Assay Kit (Pierce) i henhold til produsentens instruksjoner. Basert på en standardkurve av bovint serumalbumin (Sigma grade V) løst i MQ-vann ble proteinkonsentrasjonen i hver prøve estimert. Deretter ble prøvene fortynnet med MQ-vann til samme konsentrasjon, og videre 1:1 med Laemmli buffer (950 µl Laemmli prøvebuffer + 50 µl 2-merkaptoetanol) før de ble oppvarmet ved 95°C i 5 minutter.

---

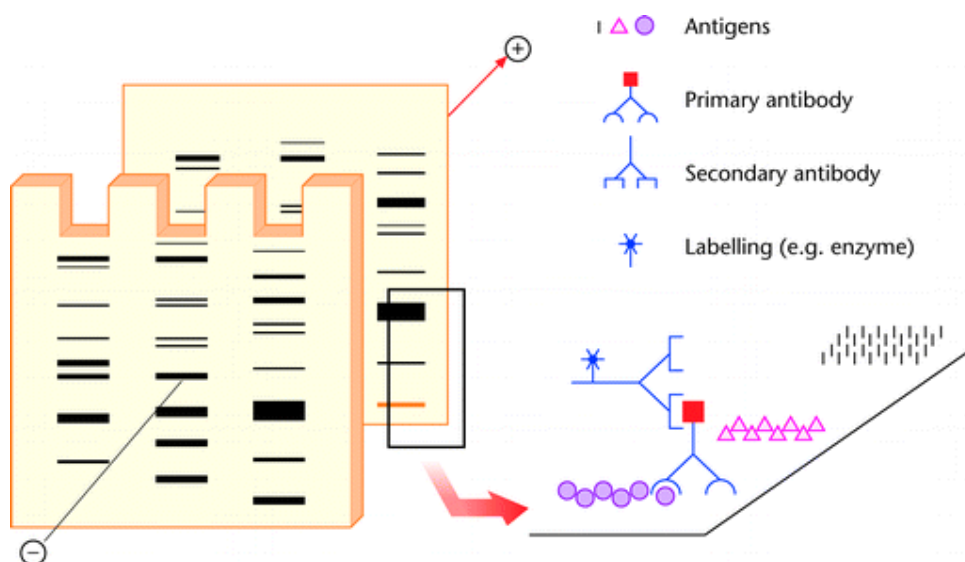
## 3.7 Westernblotting

Westernblotting er en metode som anvendes for å detektere et spesifikt protein i en prøve. Prosessen består vanligvis av 4 trinn: elektroforese, overføring av proteiner til membran, binding av probe til målmolekyl og visualisering av bundet probe.

Elektroforese benyttes for å blant annet separere proteiner i en prøve etter størrelse. Natrium dodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) -systemer, som er vanlig å benytte ved immunoblotting av proteiner, bruker buffere som inneholder en detergent, natrium dodecylsulfat (SDS), som denaturerer proteiner og gir dem en uniform, negativ ladning. I tillegg til SDS kan det tilsettes 2-merkaptøetanol som reduserer disulfidbindinger som kryssbinder noen polypeptider. Den elektroforetiske mobiliteten til protein-SDS-komplekset avhenger dermed kun av molekylvekten til proteinet.

Polyakrylamidgeler blir dannet ved kjemisk kopolymerisering av akrylamid-monomere med en kryssbindende reagent, vanligvis N,N'-metylenbisakrylamid. Dette gir en transparent gel som er kjemisk inert og mekanisk stabil (Westermeier, 2005).

Proteinprøvene appliseres på katodeenden av gelen. Deretter blir en elektrisk strøm satt på over gelen, hvilket fører til at de negativt ladede proteinene vil migrere gjennom gelen, mot anoden. Avhengig av molekyl- og porestørrelsen vil hvert protein bevege seg ulikt gjennom gelmatriksen. Store molekyler vil retarderes mer enn mindre molekyler og på denne måten blir proteinene størrelsesselektert.



**Figur 3.1 Skjematisk fremstilling av utførelsen av westernblotting.** Proteinene separeres først i en gel. Deretter overføres de til en membran som inkuberes med primærantistoff fulgt av enzymkonjugerte sekundærantistoff. Disse kan, ved tilsetning av et passende substrat, detekteres som kjemisk luminiscens. Figuren er hentet fra (Bjerrum, 2001).

Etter selve gelelektroforesen blir proteinene blottet til en membran av nitrocellulose eller PVDF. For å hindre uspesifikk binding av antistoff til membranen, blir protein-bindings seter på membranen blokkert ved hjelp av en proteinløsning som vanligvis inneholder 1-5 % (w/v) bovint serumalbumin, skummetmelk, kasein, ovalbumin eller gelatin (Bjerrum, 2001). De spesifikke proteinene merkes deretter med et primærantistoff fulgt av et sekundærantistoff som er konjugert med et enzym, for eksempel pepperrotperoksidase (Horseradish peroxidase, HRP). Dette enzymet oksiderer luminol (i ECL-løsningen) noe som resulterer i et eksitert produkt som sender ut lys (fotoner) når det går til en lavere energitilstand. Det emitterte lyset kan detekteres på en røntgenfilm eller med et videokamera. Eksponeringstiden varierer med intensiteten til signalet, som igjen avhenger av mengde protein på membranen og antistoffenes kvalitet.

### Prosedyre

Proteinene ble separert i en 10 % polyakrylamidgel med 1x TGS elektroforesebuffer. 20 µl prøve ble applisert i brønnene. Proteinstandard ("Precision Plus Protein Dual Color Standards") ble tilsatt i brønn nummer 1. I de påfølgende brønnene ble det tilsatt prøver fra henholdsvis mock-infiserte celler og celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10. Gelen ble kjørt ved 100 volt til kanten av bromfenolblått var kommet helt ned.

---

Proteinene ble så elektroblottet til en Hybond™-P membran (Amersham Biosciences) ved 100 volt over natt ved 4°C.

Deretter ble membranene farget i Ponceaus fargeløsning i 1 minutt, vasket i PBS og videre inkubert i blokkeringsløsningen (PBS + 0,1 % Tween 20 + 5 % tørrmelk. Ved bruk av antistoff mot p38 ble følgende løsning benyttet: PBS + 0,1 % Tween 20 + 5 % BSA) i 60 minutter ved romtemperatur. Membranene ble så inkubert i blokkeringsløsning tilsatt primærantistoff i passende konsentrasjon (se tabell 2.7) ved 4°C over natt. Deretter ble membranene vasket i 3 x 10 minutter med PBS + 0,01 % Tween 20 før de ble inkubert i PBS + 0,01 % Tween 20 + sekundærantistoff i passende konsentrasjon (se tabell 2.7) i 60 minutter ved romtemperatur. Videre ble membranene vasket med et stort volum vann og deretter i 10 minutter med PBS + 0,1 % Tween 20.

Reagensene til ECL-plus (Amersham Biosciences) ble blandet og membranene ble inkubert i løsningen i 5 minutter. Deretter ble overskytende ECL fjernet og luminiscens ble detektert på en røntgenfilm som ble fremkalt ved hjelp av en fremkallingsmaskin (Curix 60, AGFA).

### 3.8 Sanntids revers transkriptase PCR (Sanntids RT-PCR)

Sanntids revers transkriptase PCR (sanntids RT-PCR) er den mest sensitive metoden for deteksjon av små mengder messenger RNA (mRNA). Denne prosessen består av tre steg: syntetisering av komplementær DNA (cDNA) fra RNA, amplifisering av cDNA ved hjelp av PCR og deteksjon/ kvantifisering av amplifikasjonsproduktene (Nolan *et al.*, 2006).

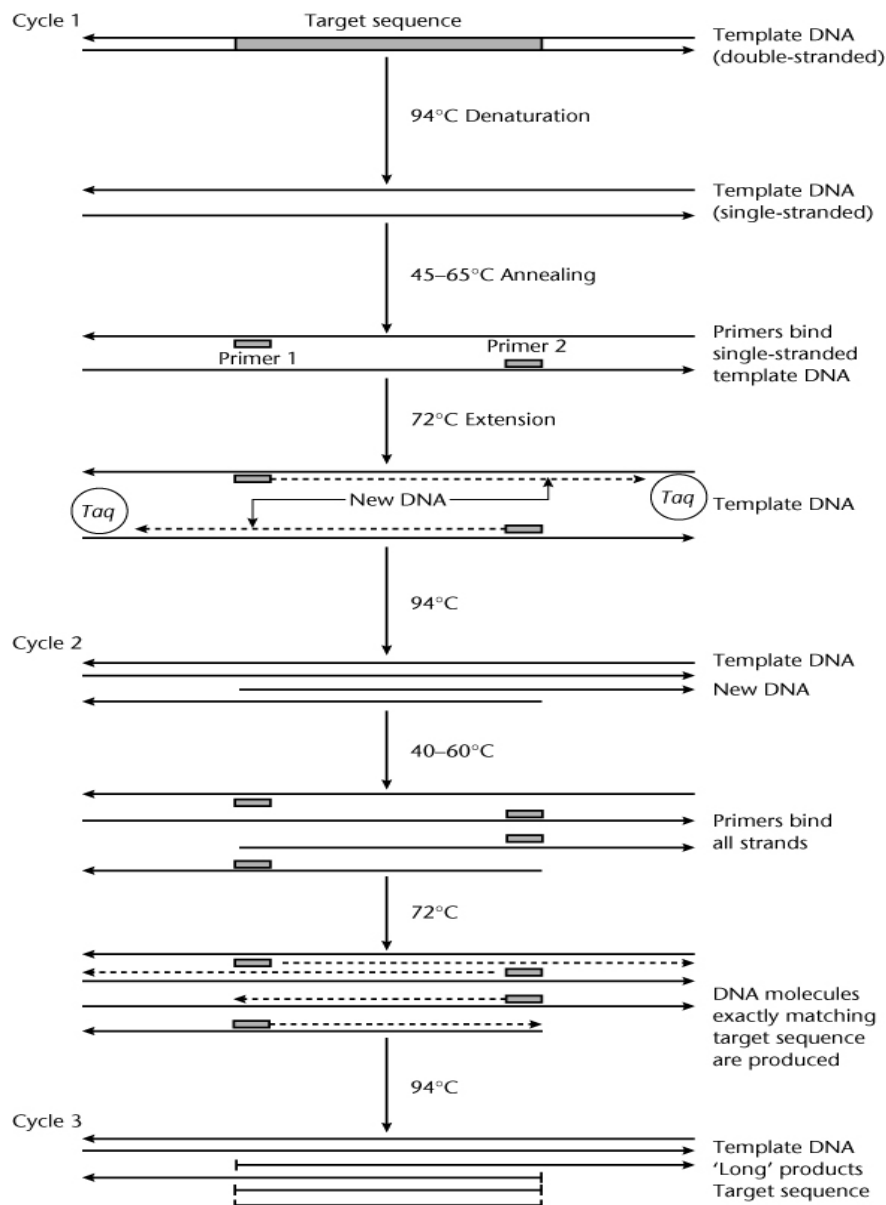
PCR er en enkel teknikk som anvendes til *in vitro* amplifisering av mål-DNA. Syntetisering av cDNA fra RNA utføres ved hjelp av enzymet revers transkriptase, og deretter benyttes det nysyntetiserte cDNAet til selve PCRen. Standard PCR gjennomføres i tre trinn (en syklus) (se figur 3.2):

- Denaturering: Reaksjonsblandingen varmes opp til rundt 95°C noe som fører til at dobbelttrådet DNA vil denaturere.
- Hybridisering: Reaksjonsblandingen kjøles ned, hvilket medfører at primerne binder seg til komplementær DNA.



- 
- Polymerisering: Dersom Taq polymerase benyttes, varmes blandingen opp til 72°C som er den optimale temperaturen for dette enzymet. DNA-syntesen foregår fra den frie 3'-OH-enden på begge primerne og det dannes en DNA-tråd som er komplementær til mål-DNA.

PCR-syklusen gjentas vanligvis mellom 25 og 35 ganger, og for hver syklus vil mål-sekvensen teoretisk sett dobles (Winter, 2005).



**Figur 3.2 Skjematisk oversikt over PCR.** Figuren er hentet fra (Winter, 2005).

Ved kvantitativ sanntids PCR måles antall templatkopier fortløpende ved hjelp av fluorescerende forbindelser. SYBR Green er en forbindelse som fluorescerer ved binding til dobbelttrådet DNA i minor groove. I løpet av de første syklusene har vi lave mengder DNA, og følgelig også lite fluorescens. Etter hvert øker produktmengden og dermed fluorescensen eksponentielt, helt til den når et platå som følge av mangel på en av reagensene (primer, nukleotider). Reaksjoner karakteriseres ofte ved det syklusantallet hvor en tidligst kan detektere amplifisering av produktet. Dette punktet kalles terskelverdien (ct: cycle threshold) og finner sted når fluorescensen er større enn (10 ganger standardavvik fra baseline) bakgrunnsfluorescensen. Ct-verdien avhenger av den initielle konsentrasjonen av mål-DNA i

prøven. En prøve med lav konsentrasjon trenger flere sykluser for å nå den gitte fluorecensverdien enn en prøve med en høy konsentrasjon (Arya *et al.*, 2005). Ct kan også bestemmes ved en annen metode som kalles ”Second Derivate Maximum Method”. Denne metoden definerer ct-verdien til en prøve ved det antall sykluser hvor fluorecenskurvens annenderiverte har høyest verdi (det vil si der hvor reaksjonen er mest optimal og samtidig er målbar) (Durtschi *et al.*, 2007). Ct-verdiene benyttes videre til ulike analyser av resultatene.

### Prosedyre

Sanntids PCR ble utført i 96-brønners plater på en LightCycler<sup>®</sup>480 (Roche). Hver brønn inneholdt et totalvolum på 20 µl bestående av:

Reagens	Mengde
2x LightCycler <sup>®</sup> 480 SYBR Green I master	10 µl
Primer, forover	2 µl (5 µM)
Primer, revers	2 µl (5 µM)
LightCycler <sup>®</sup> 480 SYBR Green I master, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PCR-gradert	1 µl
cDNA*	5 µl

\*cDNA fortynnet 1:10 unntatt ved bruk av primere mot 18S hvor cDNA var fortynnet 1:1000.


Hver reaksjon ble utført med to paralleller for å sikre at begge prøvene gav samme resultat, samt at de ikke var kontaminert. I tillegg ble det for hvert primerpar (se tabell 2.8) benyttet en kontroll, hvor cDNA var ertsatt med vann, Molecular Biology Graded. Kontrollen ble inkludert i forsøkene for å avdekke eventuell kontaminering av primere.

For kvantifisering av segment 7 ble det også satt opp en standardkurve basert på tre fortynninger av en kjent mengde cDNA fra ILAV 4. For å teste primerne mot NFκB ble det satt opp en standardkurve basert på fire fortynninger av cDNA fra ASK-celler infisert med ILAV 4 (standardkurver: se vedlegg 1).

---

Før selve analysen ble 96-brønners platen sentrifugert i 2 minutter ved 2000 rpm (Sorvall RC3C Plus. Rotor: H-6000A).

PCR ble utført under følgende betingelser:

Denaturering:	95°C	5 minutter	
Amplifisering:	95°C	10 sekunder	
	60°C	30 sekunder	
	72°C	8 sekunder	
Smelting:	95°C	5 sekunder	
	60°C	1 minutt	
	97°C	1 sekund	
Avkjøling:	40°C	10 minutter	

Gjentas 40 ganger

Smeltepunktkurven ble inkludert for å kunne undersøke at reaksjonen gav spesifikke produkter.

Ct-verdien ble definert i programvaren til LightCycler<sup>®</sup> 480 som det antall sykluser hvor fluorescenskurvens annenderiverte har høyest verdi. Ct-verdiene ble videre benyttet til relativ kvantifisering (ct-verdier > 35 ble forkastet).

### 3.9 Data-analyse og statistikk

Relativ kvantifisering beskriver endring i ekspresjon av et målgen relativt til en referansegruppe, som for eksempel en ubehandlet kontrollgruppe (Livak og Schmittgen, 2001). Relativ ekspresjon av de ulike genene ble kalkulert ved hjelp av Relative Expression Software Tool, REST-384. Alle dataene ble normalisert mot husholdningsgenene 18S og EF-1 $\alpha$ , som ble valgt på bakgrunn av en studie utført av (Jorgensen *et al.*, 2006). Signifikante forskjeller fra ekspresjon i kontrollgruppen ble kalkulert i den samme programvaren ved bruk av "Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>". Resultatene ble videre analysert ved hjelp av Sigma Stat versjon 3.0 fra SPSS Inc., Chicago,

---

USA. For å vurdere forskjeller i genekspresjon mellom celler infisert med de ulike isolatene, ble det benyttet "one way analysis of variance" (ANOVA) (n=2-3).

### 3.10 Kontroll av PCR-produkt

PCR-produktene fra kontrollprøvene (bortsett fra PCR-produkt med primere mot segment 7 hvor det ble brukt en prøve fra celler infisert med ILAV 4 ) ble testet ved agarose gelelektroforese. Dette utføres for å bekrefte at størrelsen på PCR-produktet stemmer med den teoretiske størrelsen, samt at vi har spesifikke primere som kun gir ett produkt.

#### **Prosedyre**

Hver prøve (20 µl) ble tilsatt 6 µl OrangeMix (OM) og deretter applisert på en 2 % agarosegel. Elektroforesen ble kjørt ved 100 volt i ca. 90 minutter. DNA ble deretter visualisert ved UV-bestråling og det ble tatt bilder.

### 3.11 Sekvensering av PCR-produkt

PCR-produktene testes på gel for å undersøke om de har den forventede molekyllstørrelsen. Selv om molekyllstørrelsen tilsynelatende stemmer, kan en likevel ha amplifisert feil produkt, eller man kan ha amplifisert flere produkter med relativ lik molekyllstørrelse. Ved å sekvensere PCR-produktet kan en få en bekreftelse på at det er det ønskede produktet som er amplifisert. Sekvensering av PCR-produkt kan også benyttes ved identifikasjon av et virusisolat, eller for å finne mutasjoner i et gen. PCR-produktene kan enten sekvenseres direkte, eller man kan gå veien om for eksempel TOPO TA kloning.

#### **3.11.1 Direkte sekvensering**

Direkte sekvensering vil si at PCR-produktet sekvenseres uten å gå veien om kloning. Denne metoden består av flere trinn. Det utføres først en PCR uten bruk av fluorescerende prober som kan interferere med selve sekvenseringsreaksjonen. Deretter testes PCR-produktet på en agarosegel slik at en kan estimere templatkonsentrasjonen. Videre isoleres DNA-fragmentene før de sendes til sekvensering.

---

## *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

PCR ble utført i 96-brønners plater på en LighCycler<sup>®</sup>480 (Roche). Hver brønn inneholdt et totalvolum på 20 µl bestående av:

Reagens	Mengde
DyNAzyme II DNA Polymerase	0,5 µl
Primer, forover	2 µl (5 µM)
Primer, revers	2 µl (5 µM)
10x Buffer for DyNAzyme DNA Polymerase	2 µl
dNTP mix	2 µl
Vann, Molecular Biology Graded	6,5 µl
cDNA*	5 µl

\*cDNA (fra ASK-celler infisert med ILAV 4 eller 7 fortynnet 1:10. Ved bruk av HE-primere ble det benyttet cDNA (fortynnet 1:10) fra ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10).

Hver reaksjon ble utført med tre paralleller og primere mot følgende gen ble benyttet: IFN- $\alpha$ , ISG-15, p62, galektin-9 og HE (se tabell 2.8). Primere mot HE ble designet i programmet Vector NTI Advance.

PCR-betingelser: Se avsnitt 3.8.

## *Agarose gelelektroforese*

Agarose gelelektroforese benyttes for å separere DNA-fragmenter på grunnlag av lengde og konfigurasjon. Når agarose stivner vil det dannes et nettverk som bidrar til separasjon ved at små fragmenter vil vandre hurtigere gjennom nettverket enn store fragmenter. DNA, som er negativt ladet ved nøytral pH, vil bevege seg mot anoden i et elektrisk felt og dermed bli separert i gelen. Avhengig av lengden på DNA-fragmentene som skal separeres benyttes det ulike agarose-konsentrasjoner.

---

For å visualisere DNA kan det tilsettes en fluoriserende farge i gelen. Etidiumbromid (EtBr) interkaleres mellom to basepar og fluoriserer ved bestråling med UV-lys.

### **Prosedyre**

2 gram SeaKem® LE Agarose ble løst i 100 ml 1x TAE-buffer ved koking i 1 minutt i mikrobølgeovn. Dette gav en 2 % agarosegel som i henhold til produsenten (Cambrex Bio Science) kan benyttes for å separere DNA-fragmenter i størrelsesorden 100 – 3000 bp. Etter avkjøling til under 60°C ble løsningen tilsatt 10 µl EtBr. Gelen ble støpt i et gelkar ved romtemperatur og deretter plassert i et elektroforesekar med 1x TAE-buffer. Det ble tilsatt buffer slik at det akkurat dekket gelen i karet. PCR-produkt fra én brønn fra hver reaksjon ble tilsatt OrangeMix (OM) i et volum på 3 µl OM per 10 µl prøve. NEB 100 bp (New England Biomedics) ble benyttet som standard. Deretter ble prøvene applisert og elektroforesen ble kjørt ved 100 volt i minimum 60 minutter. DNA ble deretter visualisert ved UV-bestråling.

### ***Isolering av DNA***

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) kan benyttes for å isolere dobbelt- eller enkelttrådede DNA fragmenter fra PCR og andre enzymatiske reaksjoner. DNA bindes selektivt til en silikakolonne i nærvær av en høy saltkonsentrasjon, mens urenheter vaskes bort. Til sist elueres DNA i en elueringsbuffer under basiske forhold og en lav saltkonsentrasjon. PCR-fragmenter fra 100 bp – 10 kb blir effektivt renset fra primere, nukleotider, polymeraser og salter.

### **Prosedyre**

20 – 40 µl PCR-produkt (1 – 2 brønner) fra PCR-reaksjoner med primere mot følgende gen: IFN- $\alpha$ , ISG-15, galektin-9 og p62 ble renset ved hjelp av QIAquick PCR Purification Kit i henhold til protokollen fra produsenten (Qiagen). DNA ble eluert i 30 µl elueringsbuffer og fryst ved -20°C.

### ***Sekvensering***

For hvert primerpar ble det laget to prøver på 10 µl hvor den ene prøven inneholdt forover primer og den andre revers primer. 8 µl renset PCR-produkt ble tilsatt 2 µl 5 µM primer. I de

---

tilfellene hvor agarose gelelektroforesen viste et sterkt DNA-bånd, ble PCR-produktet fortynnet 1:10. Prøvene ble levert til sekvensering i 8-strips PCR-rør.

Selve sekvenseringen ble utført av ABI-lab (ABI 3730 kapillær elektroforese-maskin), samarbeid mellom Biologisk institutt og Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo.

### **3.11.2 Kloning av PCR-produkt ved hjelp av TOPO TA kloningskit**

Ved å benytte TOPO TA kloningskit kan man sette et PCR-produkt direkte inn i en kloningsvektor, som videre transformeres inn i kjemisk-kompetente *E.coli*-celler. Ved hjelp av blå/ hvit-seleksjon kan transformerte celler selekteres. Deretter utføres det en PCR med M13-primere og transformerte celler. Dette vil gi et nytt PCR-produkt som inneholder det opprinnelige PCR-produktet som videre kan sekvenseres.

#### ***PCR***

Den lineariserte TOPO-vektoren har 3'T-overheng. Dette gjør at PCR-produkter med 3'A-overheng effektivt kan ligeres med vektoren.

#### **Prosedyre**

PCR-betingelser: se avsnitt 3.8: PCR. I tillegg ble det etter siste syklus inkludert en 7 minutters ekstensjon ved 72°C. Dette sikrer at PCR-produktet har 3'A-overheng. Det ble benyttet primere mot TNF- $\alpha$  (se tabell 2.8).

#### ***Agarose gelelektroforese***

PCR-produktet testes på gel for å sikre at vi kun har ett bånd.

#### **Prosedyre**

Se avsnitt 3.11.1: Agarose gelelektroforese. 16  $\mu$ l PCR-produkt tilsettes 4,5  $\mu$ l OM.

#### ***Kloningsreaksjon***

- Topo kloningsreaksjon: 4  $\mu$ l PCR-produkt, 1  $\mu$ l saltløsning og 1  $\mu$ l TOPO vektor ble forsiktig blandet og deretter inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Røret ble deretter plassert på is.



- 
- Transformasjon: One Shot TOP10 kjemisk-kompetente *E.coli*-celler (Invitrogen) ble tint på is før 2 µl av kloningsreaksjonen ble tilsatt. Cellene ble så inkubert på is i 5 minutter, før de videre ble varmebehandlet i 30 sekunder ved 42°C.
  - Utsåing: Det ble tilsatt 250 µl romtemperert SOC-medium til cellene, som videre ble satt i risteinkubator ved 37°C i 60 minutter ved 250 rpm (Innova™ 4200, New Brunswick Scientific). Henholdsvis 100 µl og det resterende i røret ble fordelt på to skåler som inneholdt LB-medium og 40 µl X-gal, 40 µl IPTG samt 50 µg/ µl ampicillin.

Skålene ble deretter inkubert over natt ved 37°C.

### *PCR*

3 hvite og 6 lyseblå kolonier ble plukket med en steril øse, og deretter overført til hver sin brønn i en 96-brønners PCR-plate tilsatt PCR-løsning (se avsnitt 3.11.1). Det ble benyttet M13-primere som fulgte med kitet ("TOPO TA Cloning Kit", Invitrogen).

### *Isolering og sekvensering*

Se avsnitt 3.11.1.

## 3.12 Immunofluorescens

Fluorescens er en egenskap som innehas av noen atomer og molekyler, hvor energi av en viss bølgelengde absorberes, og deretter emitteres ved en høyere bølgelengde. Dette kan kun finne sted ved visse bølgelengder, som igjen er karakteristisk for et gitt molekyl (Herman, 2003).

Immunofluorescence baserer seg på selektiviteten og affiniteten et antistoff har for dets antigen, og benytter dette i kombinasjon med fluorescerende molekyler for å detektere spesifikke targets (først og fremst proteiner) i celler og vev. For å detektere fluorescens, benyttes det et fluorescensmikroskop. Slike mikroskop sender ut eksiterende lys i passende bølgelengde, skiller eksiterende lys fra emittert fluorescens ved hjelp av filtere og sender dette til en detektor hvor det genereres et bilde (Fritschy, 2001).

---

## Prosedyre

$1,5 \times 10^5$  ASK-celler ble sådd ut i 6 brønner ( $10 \text{ cm}^2$ ) med tre dekkglass i hver brønn. Deretter ble det tilsatt 3 ml komplett L-15 medium og cellene ble inkubert ved  $20^\circ\text{C}$ . Etter 48 timer ble mediet fjernet og oppbevart til senere bruk. Cellene ble deretter vasket 3 ganger med PBS pH 7,4. Videre ble ILAV-inokulat 2, 4, 7, og 10 fortynnet i serumfritt L-15 medium, og 600  $\mu\text{l}$  fortynnet ILAV-inokulat ble tilsatt i hver sin brønn ( $\text{MOI}=1$ ). To brønner med mock-infiserte celler ble tilsatt 600  $\mu\text{l}$  serumfritt L-15 medium. Cellene ble så inkubert ved  $15^\circ\text{C}$  i 4 timer på et vippebrett ("The Belly Button"). Etter 4 timer ble det tilsatt 3 ml medium bestående av 50 % av det sparte mediet og 50 % serumfritt L-15 medium. Brønnene ble forseglet med PCR Adhesive Sealing Sheets (Eppendorf, Hamburg, Germany) og deretter inkubert ved  $15^\circ\text{C}$ .

Etter 3 dager ble mediet fjernet og cellene vasket raskt med 1 ml PBS pH 7,4. Deretter ble cellene skylt med 1 ml 80 % aceton. Videre ble cellene fiksert med 1 ml 80 % aceton i 20 minutter ved romtemperatur. Acetonen ble deretter fjernet og cellene ble tørket i 30 minutter ved romtemperatur. Videre ble dekkglassene blokkert med 2 ml PBS + 2,5 % BSA i 60 minutter. Dekkglassene ble deretter inkubert på en parafilm hvor det var tilsatt 50  $\mu\text{l}$  primærintistoff: Anti-ILAV monoklonalt antistoff 3H6F8 (Falk) fortynnet 1:200 i PBS + 2,5 % BSA. Cellene ble inkubert ved  $4^\circ\text{C}$  over natt.

Dekkglassene ble overført til en 12-brønners plate. Det ble tilsatt 200  $\mu\text{l}$  PBS og cellene ble vasket i 10 minutter. PBS-en ble fjernet og til hver brønn ble det tilsatt 250  $\mu\text{l}$  sekundærintistoff: CY2 kanin anti-mus fortynnet 1:800 i PBS + 2,5 % BSA. Platen ble dekket med folie og deretter inkubert i 60 minutter ved romtemperatur. Videre ble primærintistoffet fjernet og cellene ble vasket med 200  $\mu\text{l}$  PBS i 10 minutter. Dekkglassene ble så lagt på objektglass hvor det var tilsatt 5  $\mu\text{l}$  ProLong<sup>®</sup> Gold med DAPI før de videre ble inkubert i 15 minutter ved  $37^\circ\text{C}$ . Deretter ble cellene undersøkt i fluorescens-mikroskop (Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop).

## 4. RESULTATER

### 4.1 Sekvensering av det hypervariable området (HPR) til ILAV 2, 4, 7 og 10

Segment 6 er det gensegmentet i ILAV hvor det er størst variasjon mellom isolatene (se avsnitt 1.2.3). Denne variasjonen er begrenset til et hypervariablet område (HPR) som er karakterisert av delesjoner (Mjaaland *et al.*, 2002). For å undersøke om vi faktisk hadde de isolatene vi forventet ble et område som dekket HPR i alle isolatene sekvensert. Det ble først designet primere i programmet Vector NTI Advance (Invitrogen). Deretter ble det utført en PCR med cDNA fra ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10 som templat (se avsnitt 3.11.1). Videre ble de ulike PCR-produktene sekvensert.

			961		1020
HPR, ILAV 2	(961)	GCATTGCACAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTAAA-ACCTGC			
Sekvensert, ILAV 2	(78)	GCATTGCACAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTAAA-ACCTGC			
HPR, ILAV 4	(961)	GCATTGCACAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTAAAGATCAGG			
Sekvensert, ILAV 4	(79)	GCATTGCACAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTAAAGATCAGG			
HPR, ILAV 7	(961)	GCATTGCACAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTAAAAATCAGG			
Sekvensert, ILAV 7	(74)	GCATTGCACAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTAAAAATCAGG			
HPR, ILAV 10	(961)	GCATTGCACAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTAAAGATCAGG			
Sekvensert, ILAV 10	(77)	GCATTGCACAAGGAGATGATCAGTAAACTTCAGAGGAACATCACAGATGTAAAGATCAGG			
		1021			1080
HPR, ILAV 2	(1020)	AACATCTGTGTTGAGCAACATCTTCATTT--CTATGGGTGTAGCAGGTTTTGGGATTGCT			
Sekvensert, ILAV 2	(137)	AACATCTGTGTTGAGCAACATCTTCATTT--CTATGGGTGTAGCAGGTTTTGGGATTGCT			
HPR, ILAV 4	(1021)	GTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGAACCAAACTATGGGTGTAGCAGGTTTTGGGATTGCT			
Sekvensert, ILAV 4	(139)	GTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGAACCAAACTATGGGTGTAGCAGGTTTTGGGATTGCT			
HPR, ILAV 7	(1021)	GTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGAACCAAACTATGGGTGTAGCAGGTTTTGGGATTGCT			
Sekvensert, ILAV 7	(134)	GTAGACGCAATCCCACCTCAGCTGAACCAAACTATGGGTGTAGCAGGTTTTGGGATTGCT			
HPR, ILAV 10	(1021)	GTAGACGCAATCCCACCTCAGCTG-ATTT--CTATGGGTGTAGCAGGTTTTGGGATTGCT			
Sekvensert, ILAV 10	(137)	GTAGACGCAATCCCACCTCAGCTG-ATTT--CTATGGGTGTAGCAGGTTTTGGGATTGCT			
		1081			1140
HPR, ILAV 2	(1078)	CTGTTCCCTAGCAGGTTGGAAAGCATGTATTTGGATTGCAGCATGCATGTACAAGTCTAGA			
Sekvensert, ILAV 2	(195)	CTGTTCCCTAGCAGGTTGGAAAGCATGTATTTGGATTGCAGCATGCATGTACAAGTCTAGA			
HPR, ILAV 4	(1081)	CTGTTCCCTAGCAGGTTGGAAAGCATGTATTTGGATTGCAGCATTCATGTACAAGTCTAGA			
Sekvensert, ILAV 4	(199)	CTGTTCCCTAGCAGGTTGGAAAGCATGTATTTGGATTGCAGCATTCATGTACAAGTCTAGA			
HPR, ILAV 7	(1081)	CTGTTCCCTAGCAGGTTGGAAAGCATGTATTTGGATTGCAGCATTCATGTACAAGTCTAGA			
Sekvensert, ILAV 7	(194)	CTGTTCCCTAGCAGGTTGGAAAGCATGTATTTGGATTGCAGCATTCATGTACAAGTCTAGA			
HPR, ILAV 10	(1078)	CTGTTCCCTAGCAGGTTGGAAAGCATGTATTTGGATTGCAGCATTCATGTACAAGTCTAGA			
Sekvensert, ILAV 10	(194)	CTGTTCCCTAGCAGGTTGGAAAGCATGTATTTGGATTGCAGCATTCATGTACAAGTCTAGA			

**Figur 4.1 Alignment av det hypervariable området (HPR) til ILAV 2 (Acc.nr. DQ785246), 4 (DQ785248), 7 (DQ785251) og 10 (DQ785254), samt sekvenserte PCR-produkt fra ILAV-infiserte ASK-celler.**

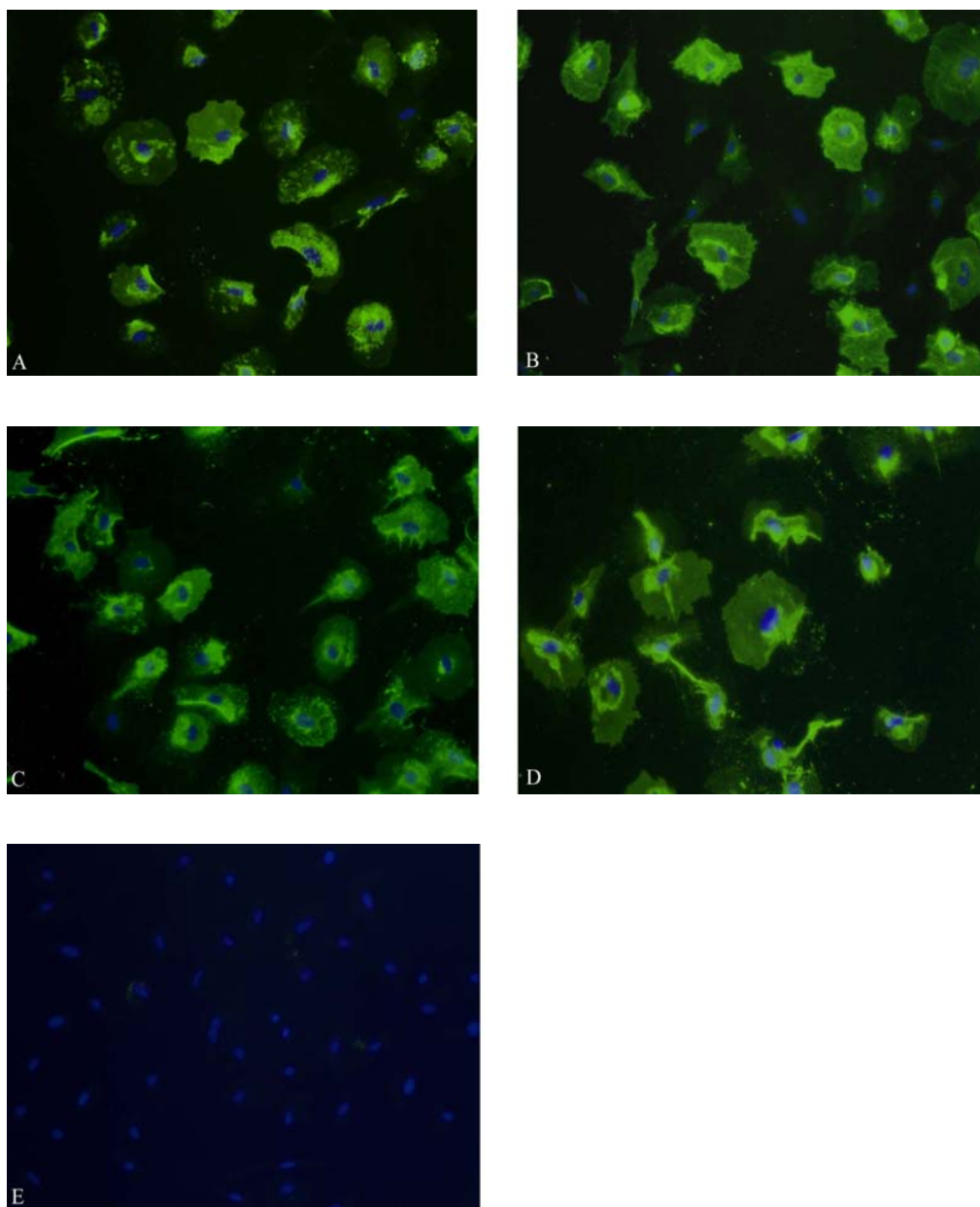
Figur 4.1 viser et alignment av det hypervariable området til ILAV 2, 4, 7 og 10, i tillegg til sekvenserte PCR-produkt. PCR-sekvensen og den tilhørende HPR-sekvensen til hvert ILAV-isolat viser en 100 % likhet, noe som bekrefter at vi har brukt ILAV isolat 2, 4, 7 og

---

10 med den samme HPR-sekvensen som i Mjaaland *et al.* (2005). Alignmentet viser også at det ikke har skjedd mutasjoner i denne regionen under oppdyrking av disse isolatene.

## 4.2 Vurdering av isolatenes evne til å infisere ASK-celler

For å vurdere om de utvalgte isolatene hadde samme evne til å infisere ASK-celler *in vitro*, samt undersøke om det var en forskjell i antall infiserte celler, ble det gjort et infeksjonsforsøk med immunofluorescens-farging av cellene. ASK-celler ble infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10 (MOI=1), samt mock-infisert som beskrevet i avsnitt 3.12. Etter tre dager ble cellene inkubert med antistoffet 3H6F8 (Falk) som er et monoklonalt antistoff rettet mot hemagglutinin-esterase proteinet (Falk *et al.*, 1998). Dette antistoffet har i tidligere studier vist seg å binde selektivt til HE, noe som gjør det godt egnet til deteksjon av ILAV-infeksjon. I tillegg ble cellekjernene farget med DAPI slik at det skulle være enkelt å identifisere antall infiserte celler i et utvalg. Videre ble cellene studert i fluorescensmikroskop med 20x objektiv.

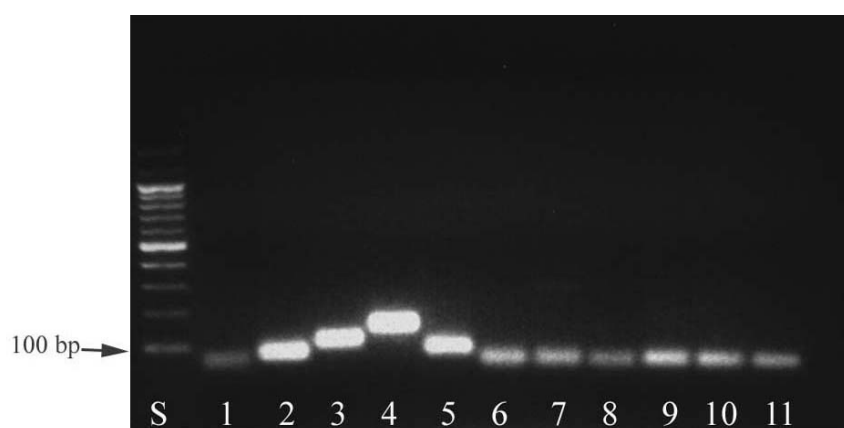


**Figur 4.2 ASK-celler infisert med ILAV 2 (A), ILAV 4 (B), ILAV 7 (C) og ILAV 10 (D) samt mock-infisert (E).** Den blå fluorescensen viser DAPI-farget DNA i cellekjernene, mens den grønne viser HE som er merket med antistoffet 3H6F8 (Falk).

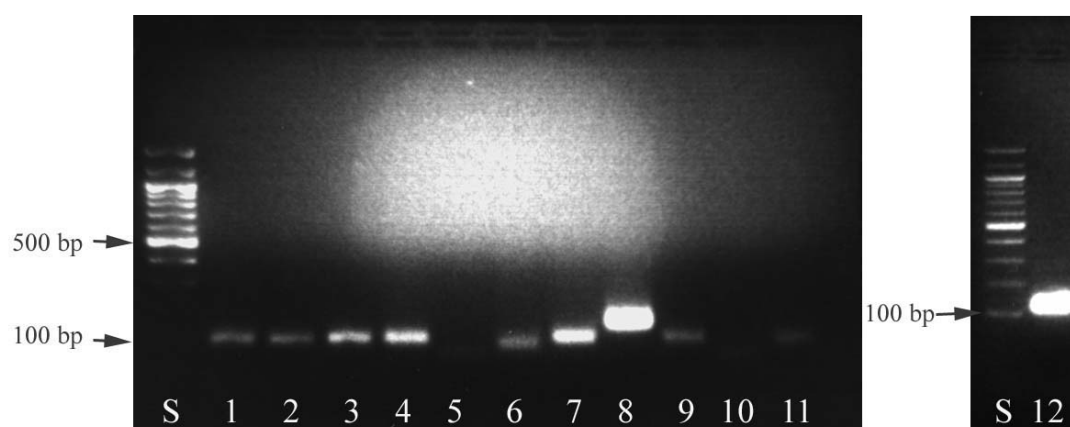
Figur 4.2 viser ASK-celler infisert med ILAV 2 (A), ILAV 4 (B), ILAV 7 (C), ILAV 10 (D) samt mock-infiserte ASK-celler (E). Som vist i figuren (bilde A, B, C og D) var nesten 100 % av ASK-cellene infisert med de respektive virus-isolatene i løpet av tre dager, mens de mock-infiserte cellene som forventet ikke viste tegn til ILAV-infeksjon (bilde E).

### 4.3 Gelelektroforese av PCR-produkt

For å undersøke om størrelsen på PCR-produktet stemte med den teoretiske størrelsen, samt at det ikke var mer enn ett PCR-produkt i hver brønn, ble PCR-produktene testet på gel som beskrevet i avsnitt 3.10.



**Figur 4.3 Gelelektroforese av PCR-produkt.** Brønn merket med S inneholder standard, 100 bp. Brønn nr. 1-11 inneholder amplifikasjonsprodukt fra henholdsvis 18S (1), EF-1 $\alpha$  (2), IFN- $\alpha$  (3), ISG-15 (4), MX (5), TNF- $\alpha$  (6), IL-1 $\beta$  (7), OGFr (8), Hsp 70 (9), Hsp 90 (10) og COX-2 (11).



**Figur 4.4 Gelelektroforese av PCR-produkt.** Brønn merket med S inneholder standard, 100 bp. Brønn nr. 1-11 inneholder amplifikasjonsprodukt fra henholdsvis PDCD5 (1), caspase 3 (2), cIAP-1 (3), bcl-2 (4), mcl-1 (5), NF $\kappa$ B (6), transaldolase 1 (7), p53 (8), p62 (9), fip-2 (10), galektin-9 (11) og segment 7 (12)

Alle amplikonene stemte med den teoretiske størrelsen (se tabell 2.8). I brønn nr. 7 (IL-1 $\beta$ ) i figur 4.3, kan en i tillegg se et bånd ved ca. 300 bp, men dette båndet er svært svakt i forhold til det dominerende båndet på 51 bp, noe som tilsier at det sannsynligvis ikke påvirker ct-verdiene til IL-1 $\beta$  i særlig stor grad. Brønn nr. 5 og 10 i figur 4.4 gir svake bånd som ikke kommer tydelig frem på bildet.

## 4.4 Sekvensering av PCR-produkt

For å verifisere at et gitt primerpar faktisk gav det ønskede amplikonet, ble utvalgte PCR-produkt sekvensert (se avsnitt 3.11). PCR-amplikon over ca. 100 basepar (bp) ble sekvensert direkte, mens amplikon under 100 bp som for eksempel TNF- $\alpha$ -produktet, bare kunne sekvenseres ved å først gå veien om kloning i en vektor. Årsaken til dette var for det første at selve sekvenseringsprosedyren fører til at de ca. 30 - 50 første baseparene ikke kommer med i den endelige sekvensen. I tillegg må PCR-produktet renses, for eksempel på en kolonne, før det sekvenseres. Den kolonnetypen vi hadde tilgjengelig (fra kitet "QIAquick PCR Purification Kit", Qiagen), var beregnet for rensing av produkter over 100 bp.

### IFN- $\alpha$

```
Score = 108 bits (58), Expect = 1e-24
Identities = 63/65 (96%), Gaps = 2/65 (3%)
Strand=Plus/Plus

Sekvensert 14      AGTTG-ATAAG-ATGTTCTGAGAAAAATGAACTACAGTGCACAGGCATGGGAGCTCATCA 71
                |||||  |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IFN- $\alpha$       444      AGTTGAATAAGAATGTTCTGAGAAAAATGAACTACAGTGCACAGGCATGGGAGCTCATCA 503

Sekvensert 72      GGAAA 76
                |||||
IFN- $\alpha$       504      GGAAA 508
```

**Figur 4.5 Alignment.** *Salmo salar* interferon- $\alpha$  1 (AY216594) og sekvensert PCR-produkt. Sekvensene har en likhet på 96 %.

---

## **ISG-15**

Score = 159 bits (86), Expect = 1e-39  
Identities = 86/88 (97%), Gaps = 0/88 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Sekvensert 12      AACTTTTRAGCGACTACGGCCTGCATTCAGGATCTAAAGTGATGGTGCTGATTACGSAGCC 71
                |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||
ISG-15      271    AACTTTGAGCGACTACGGCCTGCATTCAGGATCTAAAGTGATGGTGCTGATTACGGAGCC 330
                |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||

Sekvensert 72      CGCTCCTATCCAGGTGTTCTTGAAAAAC 99
                |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||
ISG-15      331    CGCTCCTATCCAGGTGTTCTTGAAAAAC 358
```

**Figur 4.6 Alignment.** *Salmo salar* ISG-15-liknende protein (AY926456) og sekvensert PCR-produkt. Sekvensene har en likhet på 97 %.

## **TNF- $\alpha$**

Score = 91.6 bits (49), Expect = 4e-19  
Identities = 49/49 (100%), Gaps = 0/49 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```
Sekvensert 54      AAGAGCCCAGTGTGTGGGATGAGAATTTGGTTCCCTTGTAGCTTGAACC 102
                |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||
TNF- $\alpha$  4825    AAGAGCCCAGTGTGTGGGATGAGAATTTGGTTCCCTTGTAGCTTGAACC 4777
```

**Figur 4.7 Alignment.** *Salmo salar* TNF- $\alpha$  2 (DQ787158) og sekvensert PCR-produkt. Sekvensene har en likhet på 100 %.

## **p62**

TC51407 similar to UP|SQSTM\_MOUSE (Q64337) Sequestosome-1 (Ubiquitin-binding protein p62) (52%)  
Score = 65.2 bits (30), Expect = 1e-07  
Identities = 44/46 (95%), Gaps = 2/46 (4%)  
Strand=Plus/Plus

```
Sekvensert 19      ACATTGGAGA-GGGGTGGCAGCCATGCTTA-CCCACTGGGTATCGA 62
                |||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||
p62 897          ACATTGGAGAAGGGGTGGCAGCCATGCTTAGCCCACTGGGTATCGA 942
```

**Figur 4.8 Alignment.** *Salmo salar* TC51407 og sekvensert PCR-produkt. Sekvensene har en likhet på 95 %.



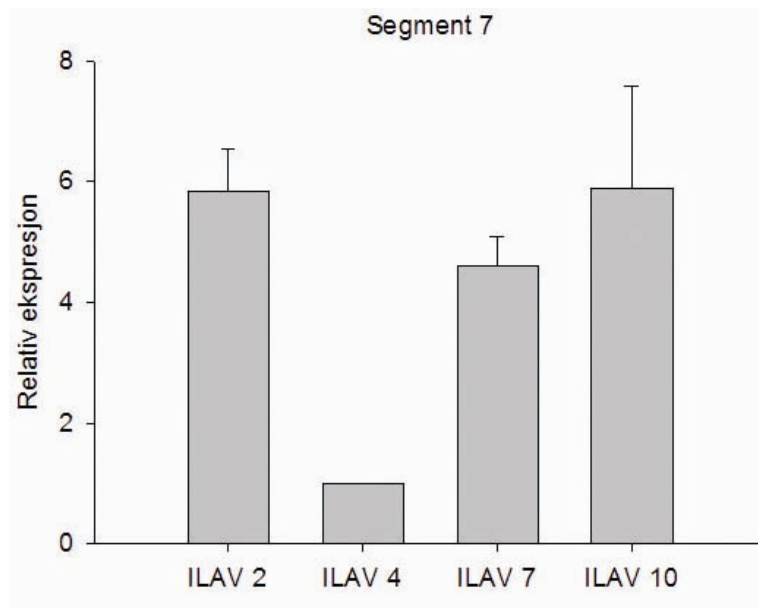
TC46079 homologue to UP|Q8QGB1\_ONCMY (Q8QGB1) VHSV-induced protein-9 (92%)  
Score = 79.8 bits (36), Expect = 4e-12  
Identities = 38/42 (90%), Gaps = 0/42 (0%)  
Strand=Plus/Plus

**Figur 4.9 Alignment.** *Salmo salar* TC46079 og sekvensert PCR-produkt. Sekvensene har en likhet på 90 %.

Figur 4.5 - 4.7 viser alignment av IFN- $\alpha$ , ISG-15 og TNF- $\alpha$  samt sekvenserte PCR-produkt. Sekvensene viser en stor likhet og i tillegg er E-verdiene ("expect") svært lave, noe som bekrefter at vi mest sannsynlig har amplifisert de ønskede produktene. Figur 4.8 og 4.9 viser alignment av gensekvenser som sannsynligvis er p62 og galektin-9 i atlantisk laks samt sekvenserte PCR-produkt. Alignmentene viser at vi mest sannsynlig har amplifisert de ønskede produktene, selv om E-verdien er større enn for de andre alignmentene.

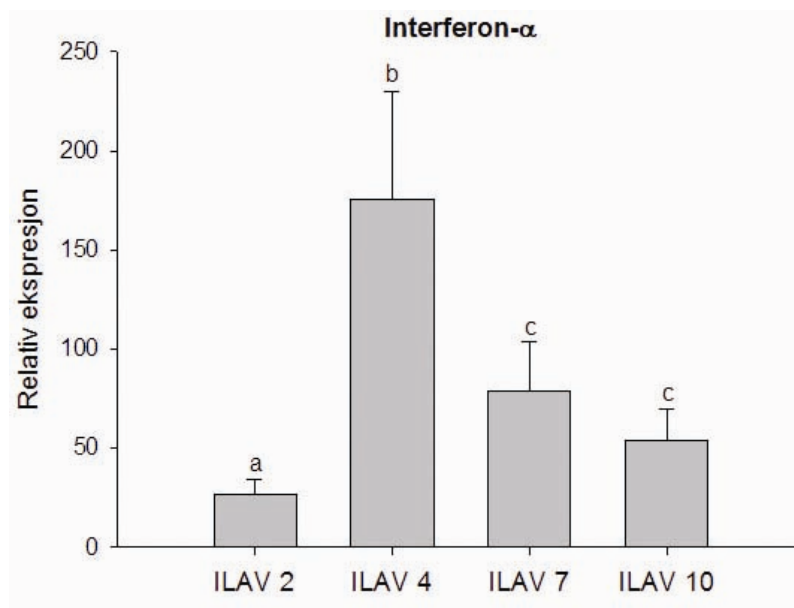
#### 4.5 Relativ ekspresjon av utvalgte gener i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10

For å undersøke om de utvalgte ILAV-isolatene inducerer ulik genekspresjonsprofil i infiserte celler, ble ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10 samt <mock>-infisert (kontrollceller) som beskrevet i avsnitt 3.2. Cellene ble videre høstet på dag tre. Alle ekspresjonsdataene ble normalisert mot husholdningsgenene 18S og EF1- $\alpha$  (Jorgensen *et al.*, 2006). Den relative ekspresjonen og eventuelle statistisk signifikante forskjeller fra kontrollen ble kalkulert ved å benytte REST<sup>®</sup> algoritmen og "Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>", ( $p$ )<0,05,  $n$ = 4-6. Videre ble statistisk signifikante forskjeller i genekspresjon mellom celler infisert med de ulike isolatene kalkulert ved hjelp av ANOVA (( $p$ )<0,05,  $n$ =2-3). Figurene under viser gjennomsnittlig relativ ekspresjon og standardavvik fra to - tre uavhengige forsøk, samt eventuelle statistisk signifikante forskjeller i genekspresjon.



**Figur 4.10** Relativ ekspresjon av segment 7 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.

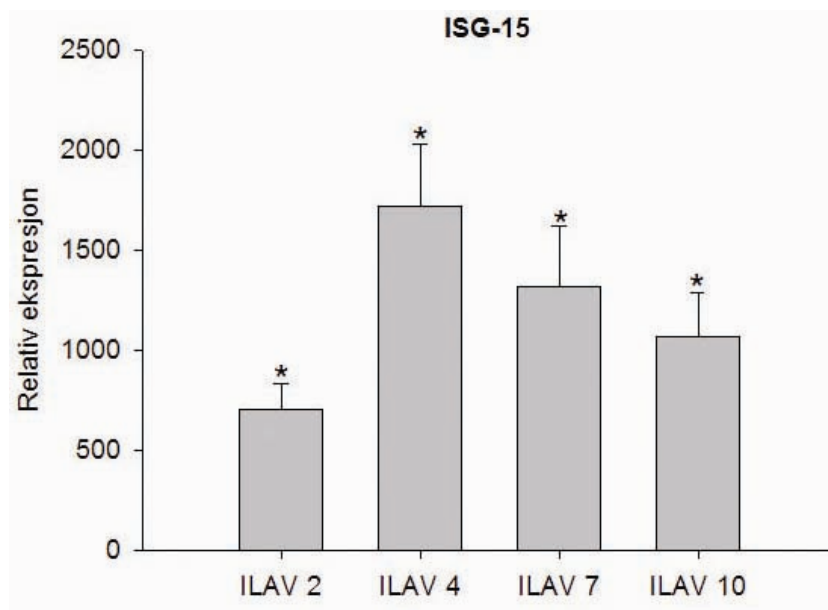
Ekspresjon er kalkulert relativt til celler infisert med ILAV 4.



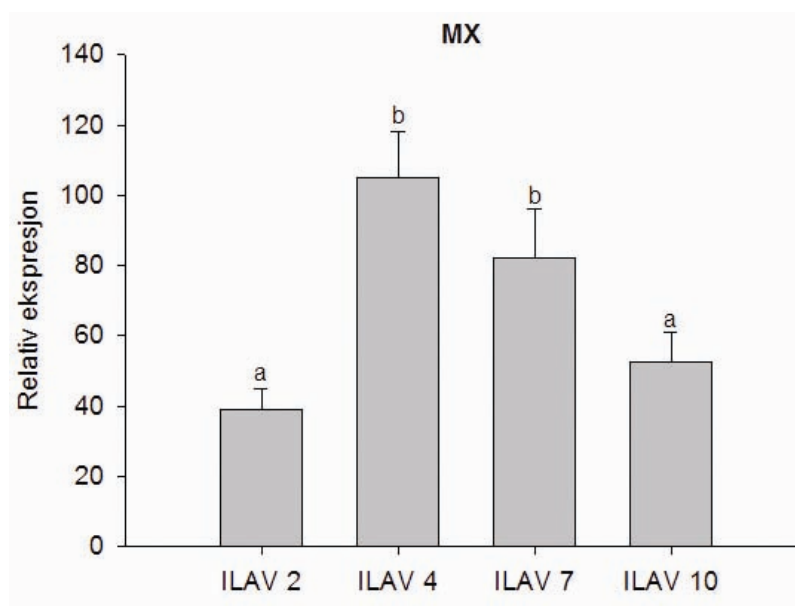
**Figur 4.11** Relativ ekspresjon av IFN- $\alpha$  i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10. Relativ

ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ .

Ulike bokstaver over søylene betegner statistisk signifikante forskjeller (én-veis ANOVA, Holm-Sidak metoden,  $(p) < 0,05$ ,  $n=3$ ).



**Figur 4.12 Relativ ekspresjon av ISG-15 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>, ( $p$ )<0,05,  $n$ =6).



**Figur 4.13 Relativ ekspresjon av MX i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . Ulike bokstaver over søylene betegner statistisk signifikante forskjeller (én-veis ANOVA, Holm-Sidak metoden, ( $p$ )<0,05,  $n$ =3).

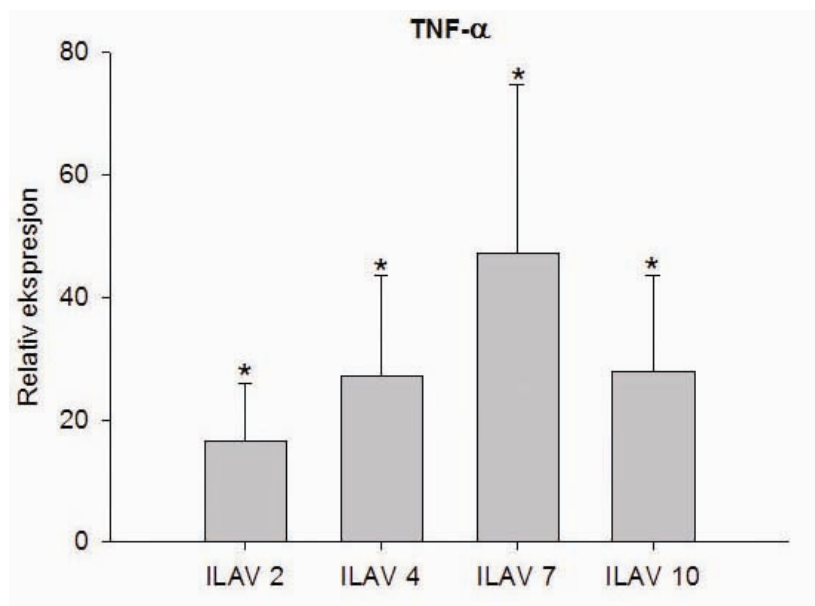
---

Ekspresjonen av segment 7 ble beregnet relativt til celler infisert med ILAV 4 som viste den laveste ekspresjonen. Celler infisert med de andre isolatene viste en transkripsjon av segment 7 som var ca. 5 - 6 ganger høyere enn i celler infisert med ILAV 4 (se figur 4.10).

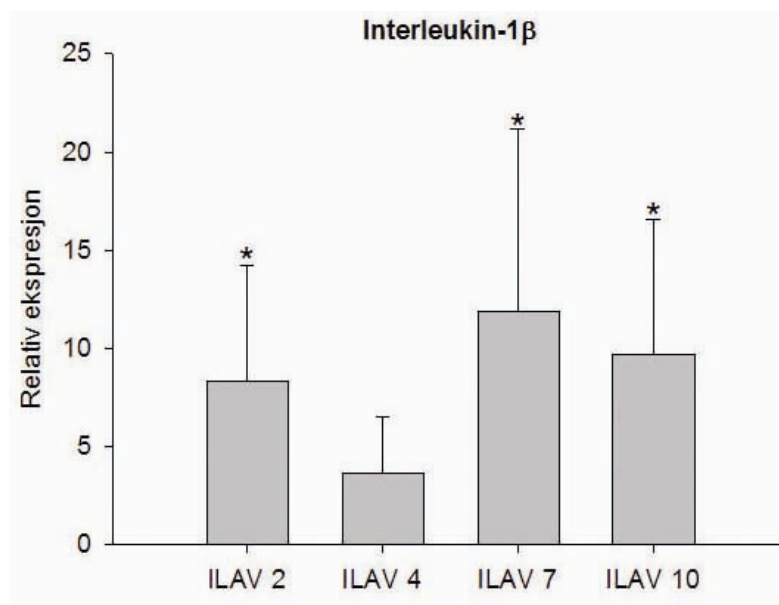
IFN- $\alpha$  er et cytokin som har en viktig funksjon i det medfødte immunforsvaret. Som vist i figur 4.11 ble IFN- $\alpha$  oppregulert ca. 27 ganger i ASK-celler infisert med ILAV 2 i forhold til kontrollcellene. Celler infisert med ILAV 4 viste den kraftigste oppreguleringen med en faktor på ca. 175. IFN- $\alpha$  ble oppregulert henholdsvis 79 og 53 ganger i celler infisert med ILAV 7 og ILAV 10. Det var statistisk signifikante forskjeller i genekspresjonen mellom alle isolatene, bortsett fra mellom ILAV 7 og ILAV 10.

ISG-15 er et antiviralt protein som induseres i respons til IFN- $\alpha/\beta$ . ISG-15 ble oppregulert ca. 700 ganger i celler infisert med ILAV 2 og ca. 1700 ganger i celler infisert med ILAV 4 som vist i figur 4.12. Det var ingen statistisk signifikante forskjeller i genekspresjonen mellom celler infisert med ulike virusisolat, men alle var signifikant forskjellig fra kontrollcellene.

MX er et annet antiviralt protein som i likhet med ISG-15 induseres i respons til IFN- $\alpha/\beta$ . Som vist i figur 4.13 ble MX oppregulert 39 ganger i celler infisert med ILAV 2. Som for IFN- $\alpha$  og ISG-15 var oppreguleringen størst i celler infisert med ILAV 4. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom celler infisert med ILAV 2 og ILAV 10, samt mellom celler infisert med ILAV 4 og ILAV 7 som også viste den høyeste oppreguleringen.



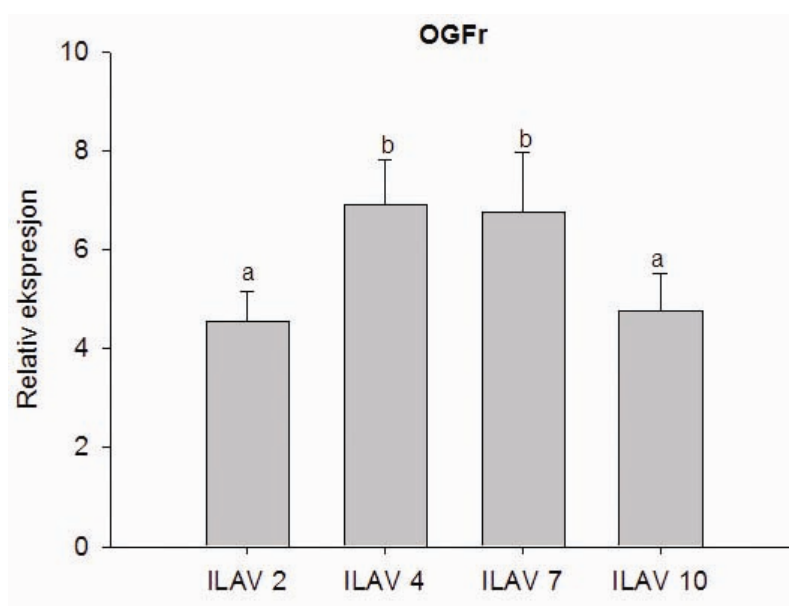
**Figur 4.14 Relativ ekspresjon av TNF- $\alpha$  i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>", ( $p$ )<0,05,  $n$ =4-6).



**Figur 4.15 Relativ ekspresjon av interleukin-1 $\beta$  i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>", ( $p$ )<0,05,  $n$ =4-6).

TNF- $\alpha$  er et proinflammatorisk cytokin som produseres av en rekke celletyper i respons til inflammasjon, infeksjon og skader. Figur 4.14 viser relativ ekspresjon av TNF- $\alpha$ . Celler infisert med ILAV 7 viste den største oppreguleringen med en faktor på 43. Det var statistisk signifikante forskjeller mellom infiserte celler og kontrollceller. Det var imidlertid ikke mulig å undersøke om det var statistisk signifikante forskjeller mellom virus-isolatene fordi det ikke var lik varians i gruppene, noe som er en forutsetning for å kunne benytte ANOVA.

Interleukiner er en av de viktigste mediatorene i kroppens respons til mikrobiell invasjon, inflammasjon, immunologiske reaksjoner og vevsskade. Celler infisert med ILAV 4 viste ingen statistisk signifikant oppregulering av interleukin-1 $\beta$ , mens celler infisert med de andre isolatene viste en oppregulering som var statistisk signifikant forskjellig fra kontrollcellene (se figur 4.15). Det var ikke mulig å undersøke om det var statistisk signifikante forskjeller mellom virus-isolatene fordi det ikke var lik varians i gruppene, noe som er en forutsetning for å kunne benytte ANOVA.



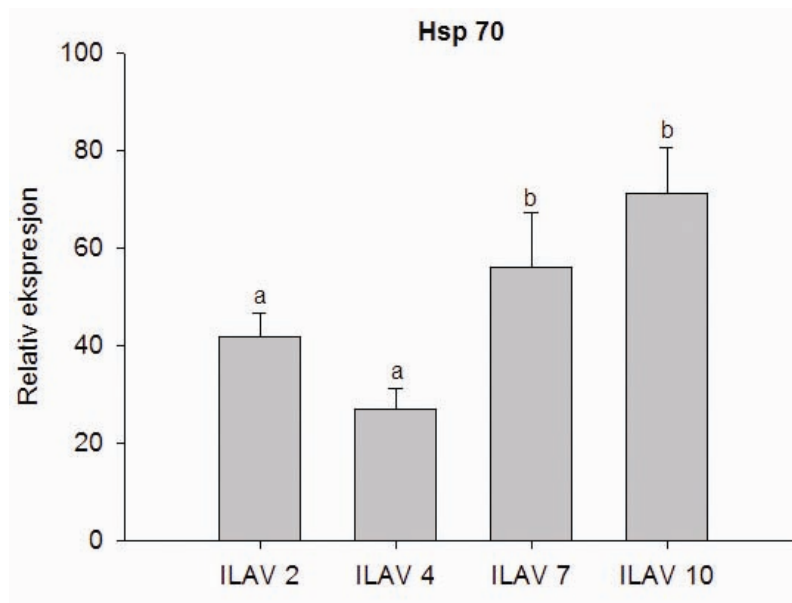
**Figur 4.16 Relativ ekspresjon av OGF-reseptor i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.**

Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ .

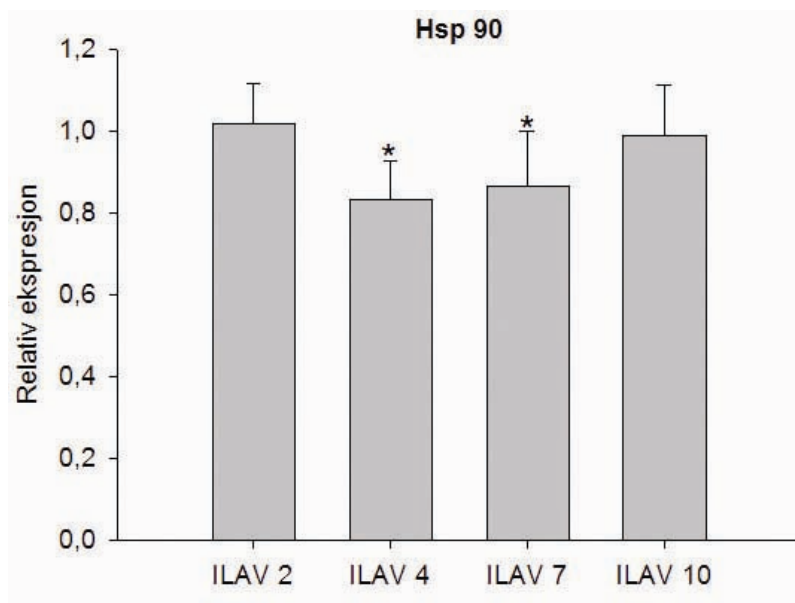
Ulike bokstaver over søylene betegner statistisk signifikante forskjeller (én-veis ANOVA, Holm-Sidak metoden ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ )).

OGF interagerer med OGF-reseptoren, noe som fører til inhibering av cellulær replikasjon og -vekst. Genekspresjonen av OGFr var mest oppregulert i celler infisert med ILAV 4 og ILAV 7 (se figur 4.16). Den laveste oppreguleringen med en faktor på ca. 4 forekom i celler

infisert med ILAV 2 og ILAV 10. Dette resultatet var også statistisk signifikant forskjellig fra genekspresjonen i celler infisert med ILAV 4 og ILAV 7.



**Figur 4.17 Relativ ekspresjon av Hsp 70 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . Ulike bokstaver over søylene betegner statistisk signifikante forskjeller (én-veis ANOVA, Holm-Sidak metoden ( $p$ )<0,05,  $n$ =3).

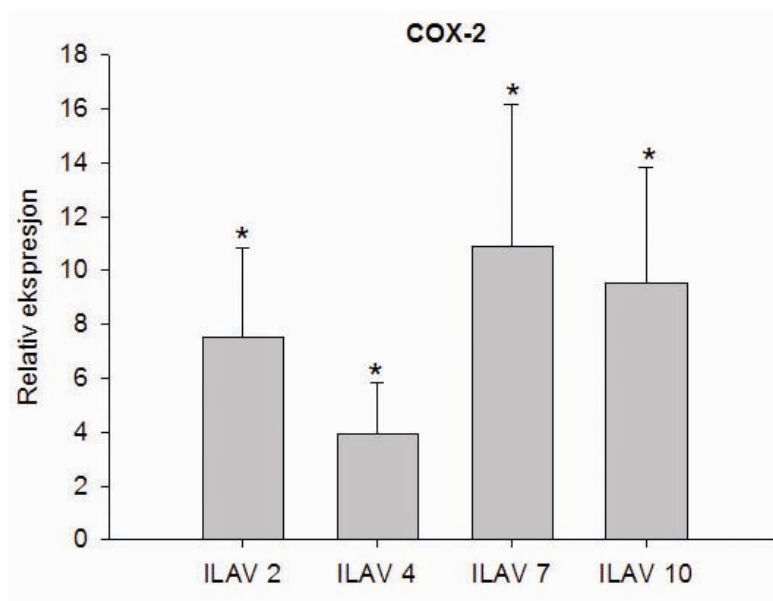


**Figur 4.18 Relativ ekspresjon av Hsp 90 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test",  $(p) < 0,05$ ,  $n=6$ ).

Ekspresjonen av heat shock proteiner (Hsp) induseres i respons til en rekke stressresponser, inkludert virale infeksjoner. Hsp 70 var minst oppregulert i celler infisert med ILAV 2 og ILAV 4, med en faktor på henholdsvis 41 og 26 (se figur 4.17). Dette var også statistisk signifikant forskjellig fra genekspresjonen i celler infisert med ILAV 7 og ILAV 10, som hadde en oppreguleringen på 56 og 71 ganger.

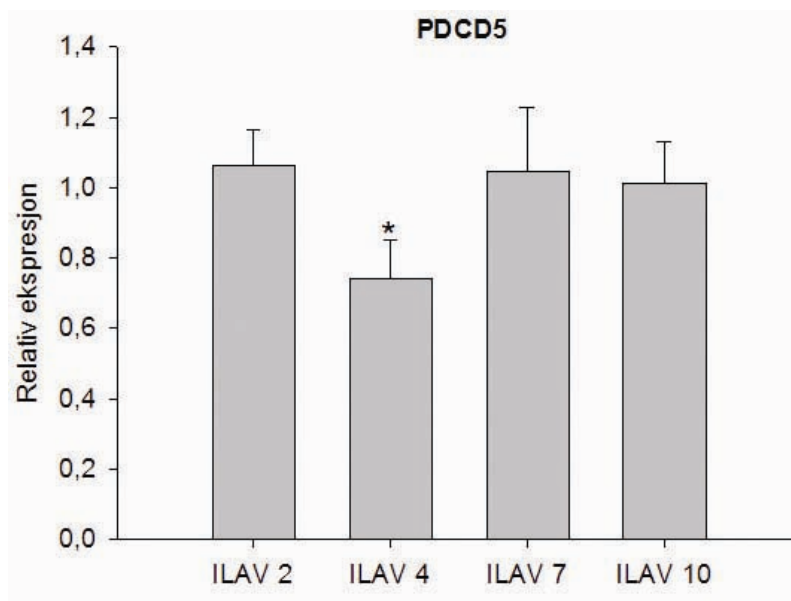
Som vist i figur 4.18 var Hsp 90 statistisk signifikant nedregulert med en faktor på henholdsvis 1,2 og 1,16 i celler infisert med ILAV 4 og ILAV 7.



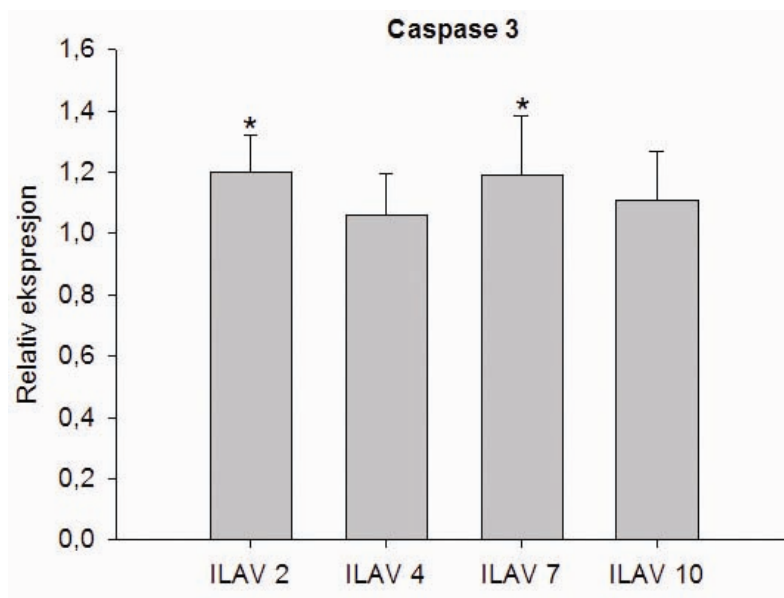


**Figur 4.19** Relativ ekspresjon av COX-2 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10. Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>", ( $p$ )<0,05,  $n$ =6).

COX-2 er et induserbart enzym som er viktig for syntese av proinflammatoriske prostaglandiner. Genekspresjonen av COX-2 var statistisk signifikant oppregulert i virusinfiserte celler i forhold til kontrollcellene (se figur 4.19). Den laveste oppreguleringen med en faktor på 4, forekom i celler infisert med ILAV 4. Datasettet var ikke normalfordelt, noe som førte til at vi ikke kunne benytte standard statistiske metoder for å undersøke signifikante forskjeller i genekspresjon mellom celler infisert med de ulike isolatene.



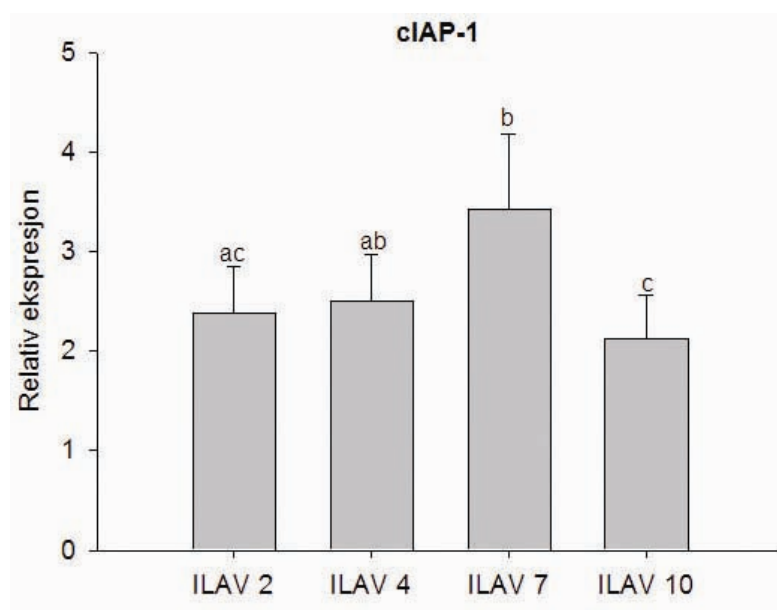
**Figur 4.20** Relativ ekspresjon av *PDCD5* i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10. Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>, ( $p$ )<0,05,  $n$ =6).



**Figur 4.21** Relativ ekspresjon av caspase 3 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10. Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>, ( $p$ )<0,05,  $n$ =6).

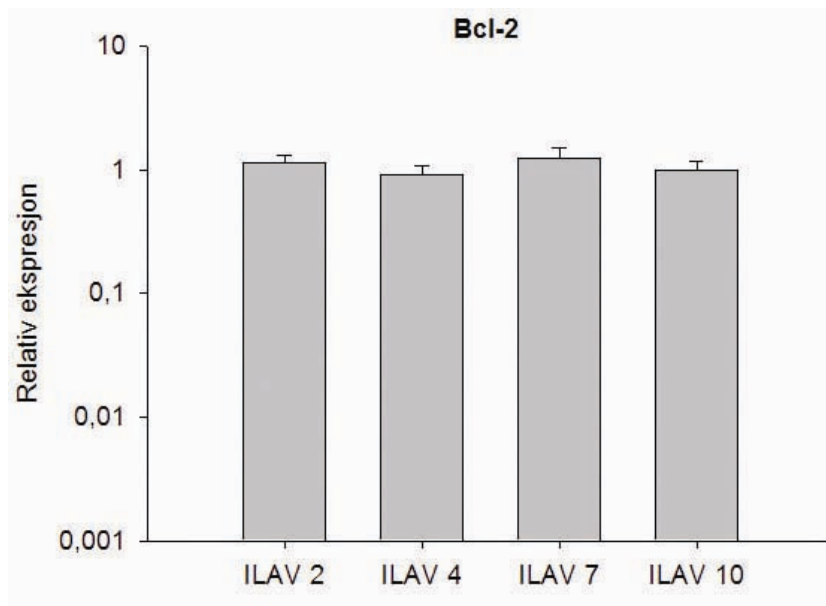
PDCD 5 er et protein som har en funksjon i regulering av apoptose. Som vist i figur 4.20 var PDCD5 statistisk signifikant nedregulert med en faktor på 1,3 i celler infisert med ILAV 4. I celler infisert med de andre isolatene, var det ikke statistisk signifikant endring i ekspresjon av PDCD5.

Caspase 3 er en effektor-caspase som har en viktig funksjon ved apoptose hvor proteinet kløyver en rekke intracellulære polypeptider. Som vist i figur 4.21 var caspase 3 statistisk signifikant oppregulert i celler infisert med ILAV 2 og ILAV 7. Det var imidlertid ingen statistisk signifikant forskjell i genreguleringen mellom celler infisert med de ulike isolatene.

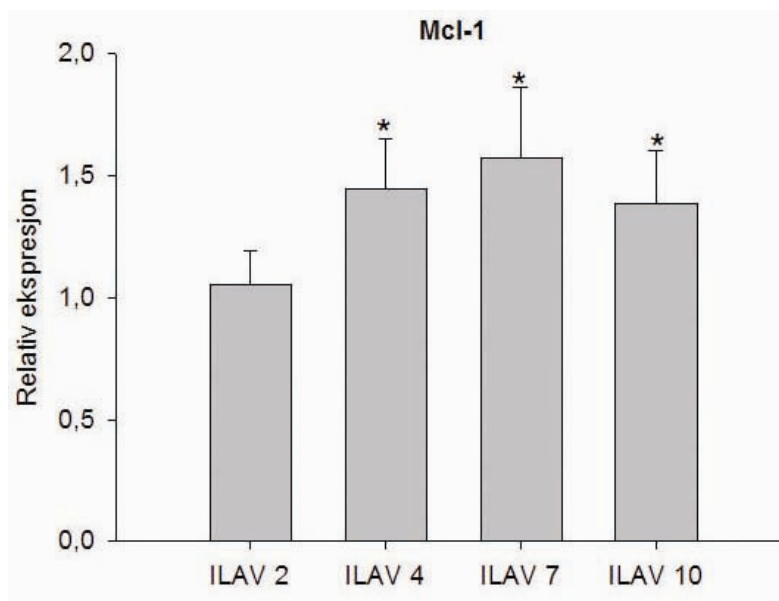


**Figur 4.22 Relativ ekspresjon av cIAP-1 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . Ulike bokstaver over søylene betegner statistisk signifikante forskjeller (én-veis ANOVA, Holm-Sidak metoden, ( $p$ )<0,05,  $n$ =3).

cIAP-1 er et protein som kan beskytte celler mot apoptotisk stimuli. cIAP-1 var statistisk signifikant oppregulert i virusinfiserte celler i forhold til kontrollen (se figur 4.22). Celler infisert med ILAV 2 og ILAV 4 viste en relativt lik oppregulering, mens celler infisert med ILAV 7 viste den høyeste oppreguleringen med en faktor på 3,4. Dette resultatet var signifikant forskjellig fra den relative ekspresjonen i celler infisert med ILAV 2 og ILAV 10.



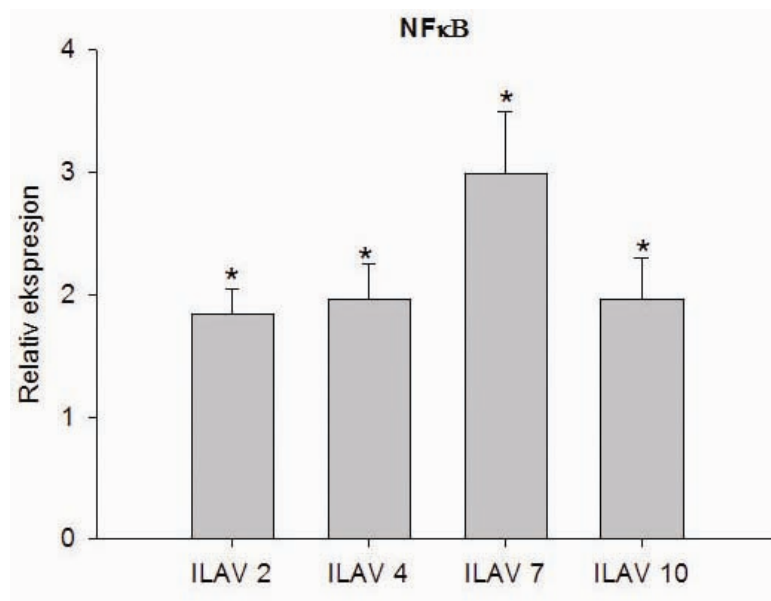
**Figur 4.23 Relativ ekspresjon av bcl-2 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>, ( $p$ )<0,05,  $n$ =6).



**Figur 4.24 Relativ ekspresjon av mcl-1 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>, ( $p$ )<0,05,  $n$ =6).

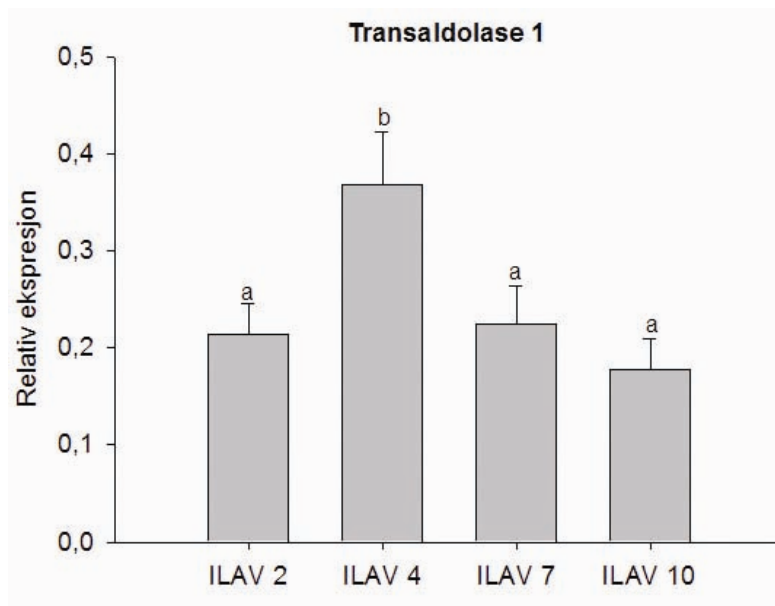
Bcl-2 er et antiapoptotisk protein. Genekspresjonen av bcl-2 var uendret i infiserte celler i forhold til kontrollen som vist i figur 4.23.

Mcl-1 er i likhet med bcl-2 også en antiapoptotisk protein som tilhører Bcl-2-familien. Genekspresjonen av mcl-1 var statistisk signifikant oppregulert i celler infisert med ILAV 4, ILAV 7 og ILAV 10 (se figur 4.24). I celler infisert med ILAV 2 var genekspresjonen uendret.



**Figur 4.25 Relativ ekspresjon av NFκB i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1-α. (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test<sup>®</sup>", (p)<0,05, n=6).

NFκB er en induserbar transkripsjonsfaktor som kontrollerer genekspresjonen av en rekke proinflammatoriske og antivirale cytokiner. Som vist i figur 4.25 var genekspresjonen av NFκB mest indusert i celler infisert med ILAV 7, mens den var relativt lik med en faktor på ca. 2 i celler infisert med de andre isolatene. Det var ingen statistisk signifikante forskjeller mellom celler infisert med de ulike isolatene.

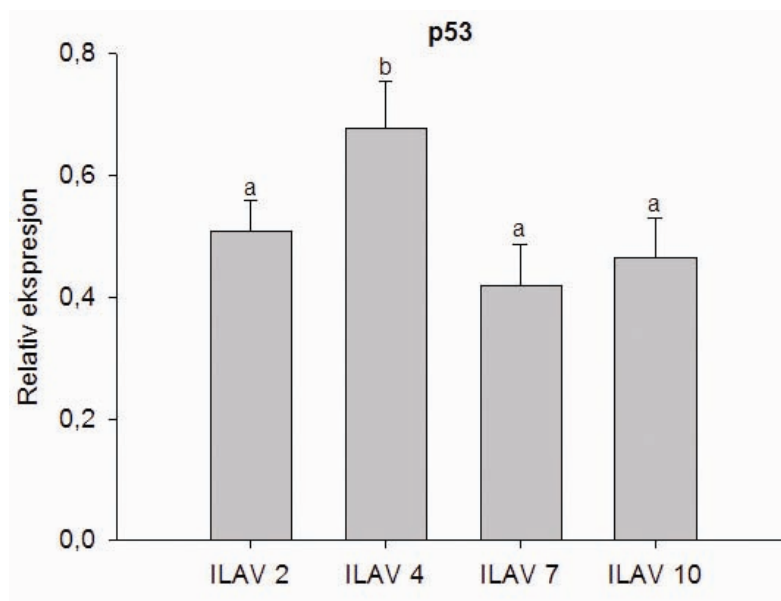


**Figur 4.26 Relativ ekspresjon av transaldolase 1 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.**

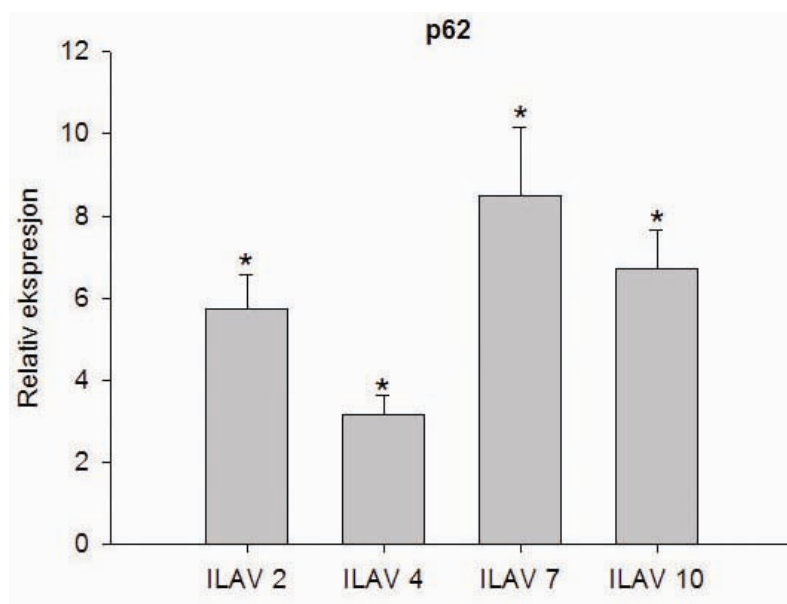
Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ .

Ulike bokstaver over søylene betegner statistisk signifikante forskjeller (én-veis ANOVA, Holm-Sidak metoden ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ )).

Transaldolase (TAL) er et viktig enzym i pentose-fosfatveien, hvor en redusert ekspresjon av TAL inhiberer apoptose. Celler infisert med ILAV 2, ILAV 7, og ILAV 10 viste den kraftigste nedreguleringen i genekspresjonen av TAL 1 i forhold til kontrollen (se figur 4.26). Genekspresjonen i celler infisert med ILAV 4 var nedregulert med en faktor på 2,7, noe som var signifikant forskjellig fra nedreguleringen i celler infisert med de andre isolatene.



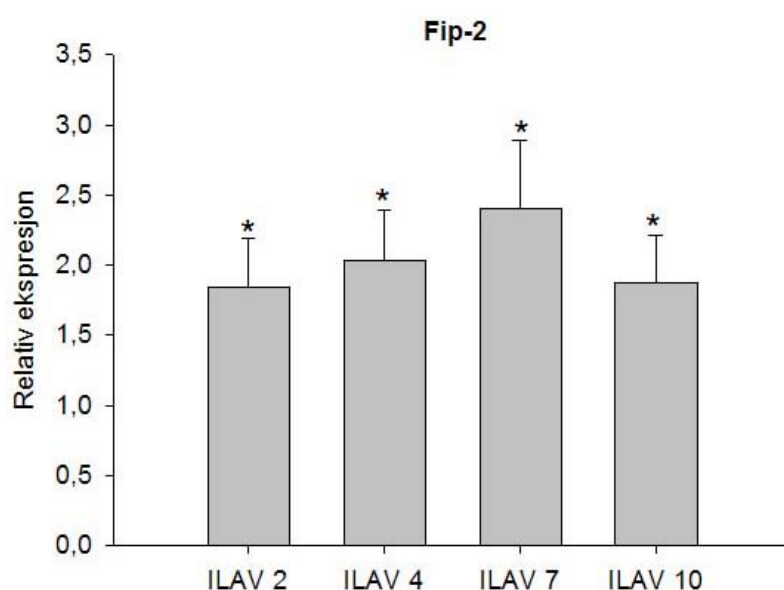
**Figur 4.27 Relativ ekspresjon av p53 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . Ulike bokstaver over søylene betegner statistisk signifikante forskjeller (én-veis ANOVA, Holm-Sidak metoden,  $(p) < 0,05$ ,  $n=3$ ).



**Figur 4.28 Relativ ekspresjon av p62 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test",  $(p) < 0,05$ ,  $n=6$ ).

Tumor suppressor proteinet p53 aktiveres i respons til ulike former for stress. Som vist i figur 4.27 var genekspresjonen av p53 redusert i virusinfiserte celler. Celler infisert med ILAV 4 viste den laveste nedreguleringen og dette var også statistisk signifikant forskjellig fra celler infisert med de andre isolatene.

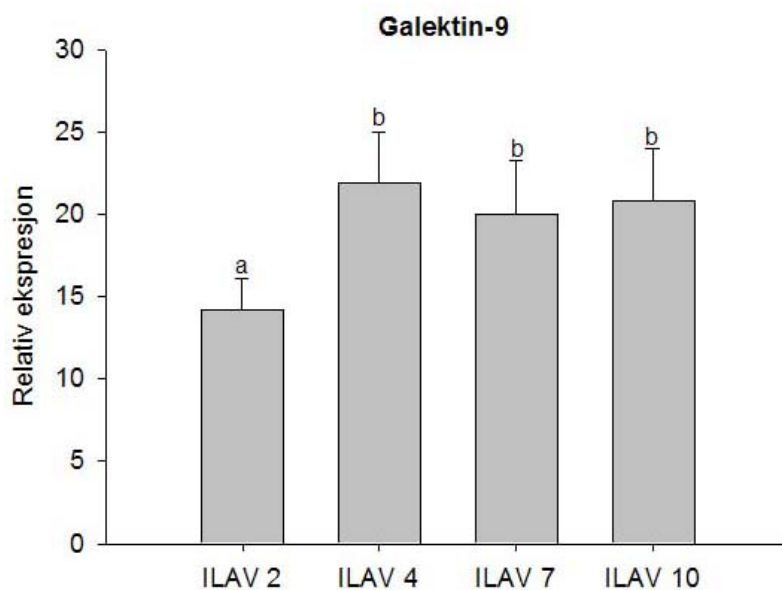
p62 er et ubiquitin-bindende protein som kan ha en regulatorisk funksjon knyttet til ubiquitin-systemet. Celler infisert med ILAV 2 og ILAV 4 viste den laveste oppreguleringen av p62 med en faktor på henholdsvis 5,7 og 3,1s (se figur 4.28). Det var imidlertid ingen statistisk signifikant forskjell i genreguleringen mellom celler infisert med de ulike isolatene.



**Figur 4.29 Relativ ekspresjon av fip-2 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.** Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ . (\*) over søylen betegner statistisk signifikant forskjell i genekspresjon fra de mock-infiserte cellene ("Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test"<sup>®</sup>, ( $p$ )<0,05,  $n$ =6).

Fip-2 kan indusere eller regulere apoptose ved å binde antiapoptotiske proteiner. Fip-2 var oppregulert i celler infisert med de ulike isolatene, men heller ikke her var det en statistisk signifikant forskjell mellom dem (se figur 4.29).





**Figur 4.30 Relativ ekspresjon av galektin-9 i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.**

*Ekspresjon er kalkulert i REST<sup>®</sup> relativt til mock-infiserte celler og normalisert mot 18S og EF1- $\alpha$ .*

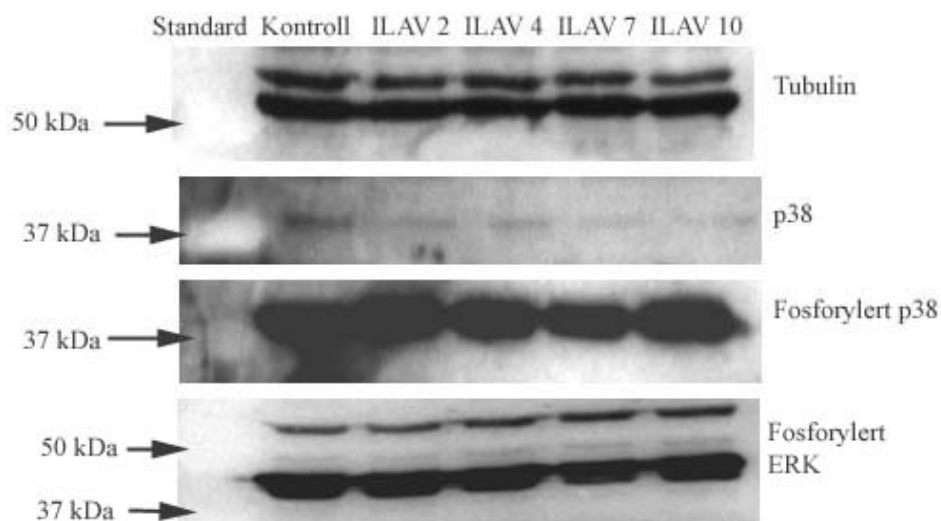
*Ulike bokstaver over søylene betegner statistisk signifikante forskjeller (én-veis ANOVA, Holm-Sidak metoden,  $(p) < 0,05$ ,  $n=3$ ).*

Galektiner er en familie av proteiner som er involvert i en rekke biologiske funksjoner slik som celleaggregering og -adhesjon, proliferering, celledød og modulering av inflammasjon. Celler infisert med ILAV 2 viste den laveste oppreguleringen av galektin-9 med en faktor på 14,2 (se figur 4.30). Dette var signifikant forskjellig fra celler infisert med de andre isolatene, som viste en noe høyere oppregulering.

## 4.6 Westernblotting

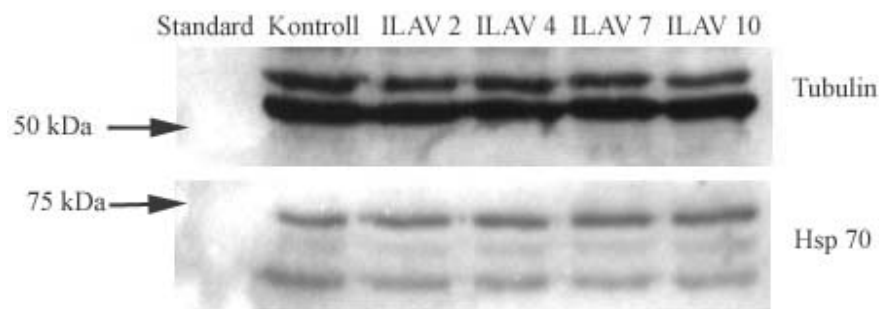
Selv om en virusinfeksjon fører til indusert transkripsjon av mRNA, så vil ikke dette nødvendigvis gi økt proteinsyntese og videre en økt effekt. Andre typer stressresponser, som for eksempel fosforylering av proteiner, kan heller ikke fanges opp av kvantitativ PCR. Proteinkinasene p38 og ERK aktiveres ved fosforylering og ikke via økt genekspresjon. Vi ønsket derfor å undersøke om det var forskjeller i proteinekspresjon i celler infisert med de ulike virus-isolatene. Det ble isolert proteiner fra ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10, samt mock-infiserte celler (kontroll) som beskrevet i avsnitt 3.7. Proteinene ble separert i en 10 % polyakrylamid gel og deretter blottet til en PVDF-membran. Membranen ble videre probet med antistoff mot følgende proteiner: p38, fosforylert p38, fosforylert ERK, Hsp70,

galektin-9 og HE. For å vurdere proteinmengden i de ulike prøvene ble det i tillegg benyttet et antistoff mot tubulin ("loading kontroll").



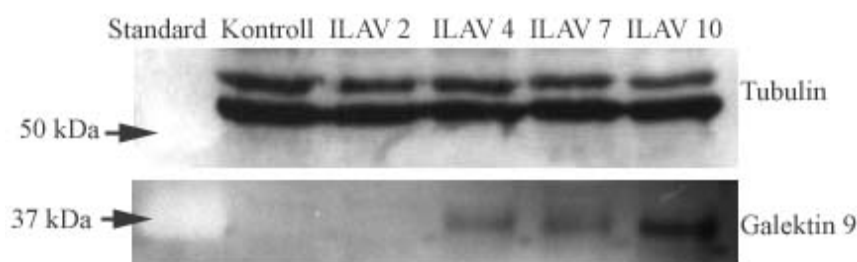
**Figur 4.31 Westernblotting av tubulin, p38, fosforylert p38 og fosforylert ERK.** Total proteinekstrakt av ASK-celler ble laget ved å lysere cellene i RIPA-buffer som beskrevet i avsnitt 3.5.

Som vist i figur 4.31 var båndintensiteten til tubulin (50 kDa) relativt lik for kontrollcellene og de ILAV-infiserte cellene. Nivået av tubulin i cellene er relativt konstant, uavhengig av for eksempel en virusinfeksjon, og kan derfor benyttes som en kontroll på hvor mye protein som er avsatt i hver brønn. I dette tilfellet så det ut som om proteinmengden var relativt lik i de ulike prøvene. Antistoffet mot p38 (38 kDa) viste ganske svake bånd på ca. 38 kDa for både kontrollen og de infiserte cellene, mens antistoffet mot fosforylert p38 viste relativt sterke bånd på ca. 38 kDa. Antistoffet mot fosforylert ERK (42 kDa) gav 2 bånd på rundt 55 og 40 kDa for alle prøvene. Det var ingen kvantitativ forskjell i proteinuttrykk mellom infiserte og uinfiserte celler.



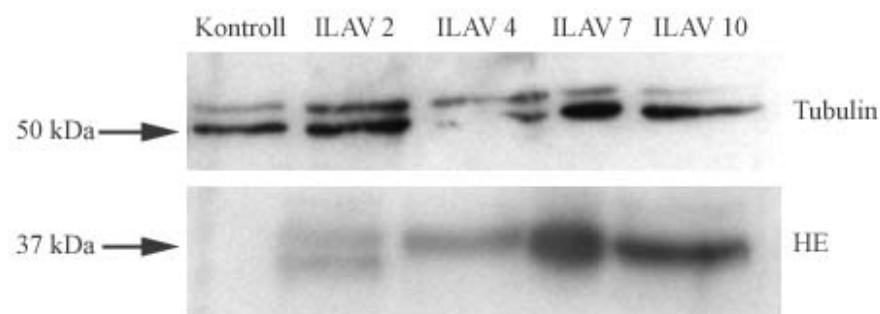
**Figur 4.32 Westernblotting av tubulin og Hsp 70.** Total proteinekstrakt av ASK-celler ble laget ved å lysere cellene i RIPA-buffer som beskrevet i avsnitt 3.5.

Figur 4.32 viser westernbånd for Hsp 70 (70 kDa). Båndintensiteten var relativt lik for alle prøvene.



**Figur 4.33 Westernblotting av tubulin og galektin-9.** Total proteinekstrakt av ASK-celler ble laget ved å lysere cellene i RIPA-buffer som beskrevet i avsnitt 3.5.

Figur 4.33 viser tydelige bånd for galektin-9 (37 kDa) i prøver fra ASK-celler infisert med ILAV 4, 7 og 10. I kontrollen og celler infisert med ILAV 2 var det ikke mulig å detektere noen bånd. Tubulinblottet viser at det var en relativt lik proteinmengde i alle prøvene, slik at en eventuell ulik tilsetning av protein i brønnene kan utelukkes som en mulig forklaring.



**Figur 4.34 Westernblotting av tubulin og HE.** Protein er isolert fra flow-through fra trinn 5 i RNA-isoleringen (se avsnitt 3.5).

Figur 4.34 viser bånd for tubulin og HE (43 kDa). Alle prøvene fra virus-infiserte celler viste HE-bånd på ca. 40 kDa. Prøven fra ASK-celler infisert med ILAV 2 viste i tillegg et bånd med en molekylvekt på rundt 35 kDa.

---

## 5. DISKUSJON

### 5.1 Diskusjon av metoder

#### 5.1.1 ASK-cellelinjen

Immunsystemet involverer et nettverk av spesialiserte organer, celler og molekyler som samarbeider om å beskytte en organisme mot sykdom. *In vitro*-studier har den fordelen at de gir en mulighet til å studere individuelle komponenter, noe som kan gi en bedre forståelse av komplekse prosesser. Dette har imidlertid visse begrensninger. En ulempe er at vi kun får et øyeblikksbilde av en prosess, men dette kan delvis overkommes ved å utføre eksperimentet som en tidsserie. Videre er celler som analyseres isolert fra deres mikromiljø, noe som kan føre til at modulerende interaksjoner ikke inkluderes i *in-vitro* modellen (Blom, 2001). Dette er noen forhold som en bør være oppmerksom på når en overfører informasjon hentet fra et *in vitro*-system til en levende organisme.

For å kunne studere og vurdere hvordan en infeksjon med de ulike virusisolatene påvirket genekspresjonen, var det avgjørende at det ble benyttet en cellelinje som var godt egnet til viral infeksjon og replikasjon av ILAV. ASK-cellelinjen er en makrofag-liknende cellelinje som stammer fra hodenyren til atlantisk laks. Den er lett å vedlikeholde, har en god evne til å adaptere til standard cellekultur-rutiner, og den gir en hurtig og distinkt cytopatisk effekt induert av ILAV (Rolland *et al.*, 2005).

#### 5.1.2 Sanntids kvantitativ PCR

Sanntids revers transkripsjon fulgt av PCR er den beste metoden for deteksjon og kvantifisering av mRNA. Metoden gir en høy sensitivitet, god reproduserbarhet og et bredt kvantifiseringsområde (Pfaffl *et al.*, 2002). Denne teknikken gjør at en kan utføre mer robuste og nøyaktige genekspresjonsstudier enn med konvensjonelle metoder (som for eksempel northern- og western-blotting), noe som er av spesiell interesse ved ekspresjonsstudier i fisk hvor det er en begrenset tilgang på spesifikke antistoffer (Jorgensen *et al.*, 2006). En viktig forbedring av sanntids PCR er nøyaktig data-normalisering. Feil i

---

kvantifisering av mRNA-transkript påvirkes i stor grad av variasjoner i mengde startmateriale mellom prøvene. For å kompensere for slike feil er det vanlig å amplifisere et stabilt husholdningsgen samtidig med målgenet. Dette husholdningsgenet fungerer som en intern standard som andre RNA-verdier kan normaliseres mot (Karge *et al.*, 1998). For å sikre at slike normaliseringsstrategier utføres med tilstrekkelig statistisk validitet, har det blitt utviklet flere matematiske modeller for sanntids PCR-kvantifisering. I denne oppgaven ble programmet Relative Expression Software Tool, REST benyttet (Pfaffl *et al.*, 2002).

### 5.1.3 Westernblotting

Westernblotting er en metode som benyttes for å detektere spesifikke proteiner i en prøve. Resultatet av slike eksperimenter avhenger av hvordan de ulike trinnene i metoden utføres, samt renheten og spesifisiteten av antistoffene som benyttes. En begrensning når det gjelder deteksjon av proteiner fra atlantisk laks, er den store mangelen på spesifikke antistoffer rettet mot epitoper på lakseproteiner. De fleste antistoffene som benyttes er rettet mot epitoper på humane proteiner, noe som gjør at de kun kan benyttes dersom antistoffet kan binde til samme eller liknende epitoper på proteiner fra laks. Videre gir bruken av monoklonale antistoffer i stedet for polyklonale antistoffer ofte problemer knyttet til spesifisitet. En nødvendighet for at teknikken skal fungere, er at det monoklonale antistoffet reagerer med det immobiliserte antigenet, som er mer eller mindre denaturert etter å ha blitt utsatt for SDS, reduserende agens, metanol og varme. I noen tilfeller vil mindre enn 1/5 av de monoklonale antistoffene som reagerer med det opprinnelige proteinet også reagere med det SDS-denaturerte proteinet. Polyklonale antistoffer derimot, vil nesten alltid reagere med konformasjons-insensitive epitoper i SDS-denaturerte proteiner. En ulempe med disse antistoffene er at de i noen tilfeller også kan reagere med andre proteiner, for eksempel på grunn av forurensninger i immunogenet (Bjerrum, 2001). Dette vil da kunne gi seg utslag i flere bånd ved en westernblotting.

## 5.2 Diskusjon av resultater

ILAV 2 og ILAV 4 er begge høypatogene virusisolat. Infeksjon med isolatene gir et akutt sykdomsforløp og en høy mortalitet. På bakgrunn av dette skulle en forvente at disse isolatene gir en relativt lik endring i genekspresjonen av utvalgte stressresponsgener. ILAV

---

7 forårsaker også en akutt sykdom, men dette isolatet har en lavere patogenisitet enn ILAV 2 og ILAV 4 basert på at det fører til lavere mortalitet blant infiserte laks. Infeksjon med ILAV 10 gir en kronisk infeksjon som er forbundet med en lav mortalitet på linje med ILAV 7.

### **5.2.1 ASK-cellelinjen: Viral infeksjon og replikasjon**

ASK-celler ble infisert med ILAV 2, 4, 7, og 10 samt mock-infisert (kontrollceller). Videre ble cellene undersøkt ved bruk av HE-antistoffet 3H6F8 (Falk) og immunofluorescensmikroskopi (dag tre). Det var ingen synlig forskjell mellom isolatene i andel infiserte celler, da tilnærmet lik alle cellene så ut til å være infisert. Som forventet viste ingen av kontrollcellene tegn til positiv farging, noe som også bekrefter antigenspesifisiteten til antistoffet. Infiserte celler så i tillegg ut til å ha en bred distribusjon av HE i cellen. Cellene ble infisert med en MOI på 1. I realiteten kan samme celle bli infisert av ett eller flere virions, mens andre da ikke blir infisert. En høy andel infiserte celler, samt den store mengden HE i cellene, tyder dermed på at virusisolatene også har en god evne til å replikere i ASK-cellelinjen. For å bekrefte dette, samt vurdere eventuelle forskjeller mellom isolatene, ble det også utført en RT-PCR på en del av segment 7. Som vist i figur 4.10 var det lavest mengde av segment 7-mRNA i celler infisert med ILAV 4. Celler infisert med ILAV 2, 7 og 10 hadde en relativt lik mengde segment 7 som var ca. 5 ganger høyere enn i celler infisert med ILAV 4. Dette indikerer at ILAV 4 replikerer i mindre grad enn de andre isolatene. En av årsakene til dette kan for eksempel være at ILAV 4 utløser en kraftigere antiviral respons som igjen fører til redusert replikasjon *in vitro*.

### **5.2.2 Forskjeller i genekspresjon i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10**

Utfallet av en viral infeksjon avhenger av en rekke interaksjoner mellom viruset og verten. Sykdom kan være en direkte konsekvens av den virale infeksjonen eller det kan skyldes vertens immunrespons mot infeksjon. Dersom et virus skal kunne være i stand til å forårsake sykdom må det først infisere verten og deretter replikere og skade vertscellene. Verten har på sin side utviklet et kraftig forsvarssystem som består av det medfødte og det adaptive immunsystemet. En av de første responsene til en viral infeksjon involverer induksjon av interferoner som videre induserer en rekke intracellulære gener som direkte forhindrer

---

virusreplikasjon/ cytolyse eller som fasiliterer apoptose (Barber, 2001). Den adaptive immunresponsen består av antigenspesifikke B- og T-lymfocytter som blant annet produserer antistoffer, samt fører til utvikling av immunologisk hukommelse (Davies, 2001).

### *Interferonrespons*

Celler infisert med ILAV 2 viste den laveste oppreguleringen av IFN- $\alpha$ , mens celler infisert med ILAV 4 viste den høyeste oppreguleringen i gruppen. En nyere studie utført av Garcia-Rosado *et al.* (2008) viser at ILAV-genomet sannsynligvis koder for minst 2 interferon-antagonist proteiner, s7ORF1 proteinet (segment 7) og s8ORF2 proteinet (segment 8). Proteinene kodet av segment 7 inhiberer sannsynligvis induksjon av interferon ved å påvirke cytoplasmiske signalveier, mens proteinet kodet av segment 8 kan binde enkelt- og dobbelt-trådet RNA (Garcia-Rosado *et al.*, 2008). En studie utført av Markussen *et al.* (2008) viser at de ulike ILAV-isolatene stor sett har et relativt likt genom. I tillegg til variasjoner i segment 6, kan en finne små variasjoner i blant annet segment 7 og segment 8 i de leserammene som koder for antagonist-proteinene (Markussen *et al.*, 2008). Disse variasjonene gir også utslag i aminosyresekvensen til de tilhørende proteinene (se vedlegg 2), noe som vil kunne påvirke proteinets funksjon. Dette kan derfor være en mulig årsak til den ulike induksjonen av IFN- $\alpha$  som observeres i ASK-celler infisert med ILAV 2, 4, 7 og 10.

ISG-15 er et av de tidligste og mest dominante proteinene som induseres i pattedyr som følge av IFN- $\alpha/\beta$ -stimulering, noe som tilsier at det har en viktig funksjon i interferonsystemet (Ritchie og Zhang, 2004). Studier har i tillegg vist at ISG-15 kan stimulere proliferasjon av NK-celler samt inducere leukocyt-cytotoksitet i nærvær av T-celler (Ritchie og Zhang, 2004). Som vist i figur 4.12 var ISG-15 mest oppregulert i celler infisert med ILAV 4, mens den laveste oppreguleringen forekom i celler infisert med ILAV 2. Det var imidlertid ingen statistisk signifikant forskjell mellom isolatene.

Det interferonstimulerte genet MX, har en dokumentert, antiviral effekt i pattedyr. Nylig har det også blitt vist at proteinet har en antiviral effekt mot infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) i laks (Larsen *et al.*, 2004). MX var i likhet med ISG-15 mest oppregulert i celler infisert med ILAV 4, mens celler infisert med ILAV 2 viste den laveste oppreguleringen. Oppreguleringen av både ISG-15 og MX viste et mønster som lignet effekten på IFN- $\alpha$ , noe som også var å forvente da dette er interferonstimulerte gener. ILAV 4 induserte den kraftigste oppreguleringen av IFN- $\alpha$  og i tillegg var også oppreguleringen av MX nesten 3



---

ganger høyere enn i celler infisert med ILAV 2. ILAV 4 var også det isolatet som replikerte minst *in vitro* (basert på transkripsjon av segment 7), noe som kan skyldes den kraftige induksjonen av IFN og IFN-stimulerte gener. Tidligere studier derimot, viser at verken MX eller ISG-15 er i stand til å undertrykke replikasjon av ILAV *in vitro* eller *in vivo* (Kileng *et al.*, 2007). En kraftig stimulering av det medfødte immunforsvaret vil også føre til inflammasjon. Dette, i tillegg til at viruset ikke inhiberes av interferonsystemet, vil kunne bidra til vevsskade og sykdom, noe som kan være en medforklarende årsak til hvorfor ILAV 4 forårsaker en høy mortalitet blant infiserte laks.

### ***Cytokiner og stressrespons***

Interleukin-1 $\beta$  er et proinflammatorisk cytokin som produseres av en rekke celletyper i respons til blant annet andre cytokiner (Meager og Wadhwa, 2007). Rekombinante IL-1 $\beta$ -molekyler har i ørretceller vist seg å fungere som kjemokiner som tiltrekker leukocytter, induserer ekspresjon av MHC klasse-II $\beta$  og øker autokrin stimulering av egen ekspresjon (Huisin *et al.*, 2004). En studie som testet effekter av IL-1 $\beta$  i mus konkluderte med at IL-1 $\beta$  er en potent aktivator av den humorale immunresponsen, og at dette er gunstig for verten fordi immunresponsen mot bakterier og virus øker under en infeksjon (Nakae *et al.*, 2001). IL-1 $\beta$  var statistisk signifikant oppregulert i celler infisert med ILAV 2, 7 og 10 i forhold til kontrollen, mens celler infisert med ILAV 4 ikke viste en signifikant oppregulering. Det var imidlertid ikke mulig å undersøke eventuelle statistisk signifikante forskjeller mellom isolatene ved hjelp av ANOVA, fordi denne testen forutsetter at det er lik varians i gruppene, noe det i dette tilfellet ikke var. Resultatene kan indikere at ILAV 2, 7 og 10 induserer en kraftigere adaptiv immunrepons enn ILAV 4, noe som kan bidra til en forklaring på hvorfor ILAV 7 og ILAV 10 forårsaker en relativt lav mortalitet blant infiserte laks (Mjaaland *et al.*, 2005). For å undersøke om det faktisk er en forskjell mellom isolatene, bør forsøket gjentas med flere paralleller.

Tumor nekrose faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) tilhører en familie av ligander som har en viktig funksjon i immunforsvaret og ved inflammasjon (Savan *et al.*, 2005). TNF er et proinflammatorisk molekyl som kan fungere som en ko-stimulator for NK-celler og aktiverte B- og T-lymfocytter (Branschädel *et al.*, 2007). En eventuell oppregulering av TNF- $\alpha$  i celler infisert med ILAV 7 og ILAV 10, kan indikere at disse isolatene induserer en kraftigere adaptiv immunrespons, noe som videre kan bidra til en effektiv eliminering av patogenet og dermed

---

en lavere mortalitet blant infiserte laks. Resultatene viste at TNF- $\alpha$  var signifikant oppregulert i infiserte celler i forhold til kontrollen. Den høyeste oppreguleringen forekom i celler infisert med ILAV 7. Det var imidlertid ikke mulig å undersøke eventuelle statistisk signifikante forskjeller mellom isolatene ved hjelp av ANOVA, fordi det ikke var lik varians i gruppene. Oppreguleringen i forhold til kontrollcellene indikerer at TNF- $\alpha$  har en rolle under ILAV-infeksjon, men det er usikkert om dette har betydning for forskjellen i patogenisitet som observeres *in vivo*. For å vurdere eventuelle forskjeller mellom isolatene, må forsøket gjentas med flere paralleller.

Heat shock proteinene (HSP) induseres under cellulært stress, for eksempel som følge av varme-eksponering eller virale infeksjoner (Schumann, 2001). Medlemmer av Hsp 70-familien har et peptid-bindende domene som fører til at de kan interagere med en rekke peptider. De resulterende Hsp:peptid-kompleksene er kjent for å være kraftig immunogene. Slike komplekser har en evne til å frembringe CD8 T-celleresponser, og i tillegg har Hsp 70 også vist seg å kunne indusere antigen-spesifikk proliferering av humane CD4 T-celler (Haug *et al.*, 2005). Celler infisert med ILAV 2 og ILAV 4 viste den laveste oppreguleringen av Hsp 70, mens celler infisert med ILAV 7 og ILAV 10 viste en høyere oppregulering som også var statistisk signifikant forskjellig fra ILAV 2 og ILAV 4. Dette indikerer at de høypatogene isolatene i mindre grad trigger induksjon av Hsp 70. Dersom Hsp 70 også kan indusere proliferering av CD4 T-celler og CD8 T-celleresponser i atlantisk laks, så kan dette bety at ILAV 7 og ILAV 10 vil indusere en kraftigere T-cellerespons enn ILAV 2 og ILAV 4. En kraftigere adaptiv immunrespons som effektivt eliminerer patogenet, kan være en medvirkende årsak til den ulike patogenisiteten som observeres *in vivo*. Proteinekspressjonen av Hsp 70 ble også undersøkt ved immunoblotting. Som vist i figur 4.32 var båndintensiteten til Hsp 70 relativt lik for prøvene fra infiserte og uinfiserte celler. Dette forsøket ble utført flere ganger med prøver fra tre uavhengige infeksjonsforsøk, men det var kun med prøver fra det ene forsøket hvor det var mulig å detektere protein. Årsaken til dette var sannsynligvis at det var lavere mengder protein i prøvene fra to av infeksjonsforsøkene. Resultatet fra det ene forsøket tyder på at den forskjellen som observeres på mRNA-nivå ikke gjenspeiles på protein-nivå, men for å bekrefte dette må forsøket gjentas.

Hsp 90 er et annet heat shock protein som sannsynligvis er involvert i sammensetning og kjernetransport av influensavirus RNA-polymerase-subenheter (Naito *et al.*, 2007). Hsp 90 var statistisk signifikant nedregulert i celler infisert med ILAV 4 og ILAV 7. Det var

---

imidlertid ingen signifikant forskjell i genekspresjonen mellom celler infisert med de fire isolatene. Dette indikerer at Hsp 90 ikke har en uttalt effekt på den ulike patogenisiteten som observeres *in vivo*.

Opioid vekstfaktor interagerer med reseptoren opioid vekstfaktor-reseptor (OGFr) noe som fører til inhibering av cellereplikasjon og -vekst under utvikling, neoplasi, sårtilheling og angiogenese. Figur 4.16 viser at OGFr er oppregulert i celler infisert med ILAV 2 og ILAV 10, mens den høyeste oppreguleringen forekommer i celler infisert med ILAV 4 og ILAV 7. Isoformen av OGFr i atlantisk laks ser ut til å være forkortet sammenlignet med isoformer fra menneske og mus, noe som kan påvirke funksjonen til proteinet (Matejusova *et al.*, 2006). Det er derfor usikkert om en forskjell i ekspresjon av OGRr vil ha en innvirkning på den ulike patogenisiteten som observeres *in vivo*, og eventuelt i hvilken grad.

Cykloxygenase-2 (COX-2) er et enzym som katalyserer oksidasjon av arakidonsyre til prostaglandin H<sub>2</sub> som er forløper for prostanoider. Enzymet induseres i de fleste mammalske celletyper i respons til proinflammatoriske eller mitogene aktivatorer. Effekter av prostaglandiner inkluderer nedregulert leukocyttfunksjon, lymfocytproliferasjon og antistoffproduksjon (Steer og Corbett, 2003). Figur 4.19 viser at COX-2 er statistisk signifikant oppregulert i celler infisert med alle isolatene i forhold til kontrollen. Den kraftigste oppreguleringen forekom i celler infisert med ILAV 7 og ILAV 10. Det var imidlertid ikke mulig å undersøke eventuelle forskjeller mellom isolatene ved å benytte standard statistiske metoder, fordi datasettet ikke var normalfordelt. En studie utført av Carey *et al.* (2005) viser at en mangel på COX-2 fører til redusert inflammasjon og redusert mortalitet og morbiditet til tross for høye virustiter etter en influensavirus type A-infeksjon (Carey *et al.*, 2005). Dersom det faktisk er signifikante forskjeller mellom isolatene, så kan dette indikere at ILAV 7 og ILAV 10 vil indusere en kraftigere inflammasjon og en redusert adaptiv immunrespons i forhold til ILAV 2 og ILAV 4. Dette korrelerer ikke med patogenisiteten som observeres *in vivo*, fordi en da skulle forvente at de lavpatogene isolatene induserte en lavere oppregulering av COX-2 enn de høypatogene isolatene. For å undersøke eventuelle forskjeller mellom isolatene må forsøket gjentas med flere paralleller.

## Apoptose

En vellykket viral replikasjon avhenger ikke kun av en effektiv produksjon og spredning av virions, men også evnen til å unnsnippe vertens forsvarsmekanismer som begrenser

---

replikasjon ved å drepe infiserte celler. En infeksjon forårsaket av de fleste virus vil i tillegg til å trigge en immun- og inflammatorisk respons, også trigge apoptose. Denne celleresponsen forekommer ofte som en direkte følge av viral replikasjon, men det finnes også noen virus som benytter seg av apoptose som en mekanisme for spredning av virions. En effektiv replikasjon vil i begge tilfeller avhenge av at viruset har en evne til å blokkere eller forsinke apoptose frem til et tilstrekkelig antall virions har blitt produsert (Roulston *et al.*, 1999).

Programmed Cell Death Protein (PDCD) 5 er relatert til regulering av apoptose. Studier viser at nivået av proteinet øker under apoptose, samt at proteinet hurtig translokerer fra cytosol til kjernen (Chen *et al.*, 2001). PDCD5 er statistisk signifikant nedregulert i celler infisert med ILAV 4, mens celler infisert med de andre isolatene ikke er forskjellig fra kontrollen. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom celler infisert med de ulike isolatene. Dette kan indikere at cellene ikke undergår apoptose så tidlig i infeksjonsforløpet eller at virus-isolatene motvirker induksjon av PDCD5. En annen mulighet er at proteinet ikke har den samme funksjonen i atlantisk laks, og at det er årsaken til at vi ikke ser noen endring i genekspresjon.

Caspase 3 er en effektorcaspase som er involvert i apoptose. Aktiverte caspaser kløyver en rekke intracellulære polypeptider, noe som bidrar til de stereotypiske morfologiske og biokjemiske endringene som karakteriserer en apoptotisk celle (Earnshaw *et al.*, 1999). Caspase 3-liknende aktivitet benyttes derfor ofte som et kvantitativt mål på apoptose (Watanabe *et al.*, 2002). Genekspresjonen av caspase 3 er statistisk signifikant oppregulert i celler infisert med ILAV 2 og ILAV 7, mens celler infisert med ILAV 4 og ILAV 10 ikke viser noen endring i forhold til kontrollen. Det var imidlertid ingen statistisk signifikant forskjell mellom celler infisert med de ulike isolatene. En mulig forklaring på dette er at caspase 3 eksisterer som et inaktivt zymogen, som aktiveres ved kløyving av andre caspaser, eventuelt proteaser (Boatright og Salvesen, 2003). Apoptose kan derfor ikke nødvendigvis assosieres med en endring i genekspresjon av caspase 3. En studie utført av Joseph *et al.* (2004) indikerer at ILAV-indusert apoptose i SHK-1 celler finner sted via caspase-aktiveringsveien, men at denne muligens ikke inkluderer caspase 3 (Joseph *et al.*, 2004). Dersom det samme gjelder for ILAV-infiserte ASK-celler, så kan dette være en annen forklaring på hvorfor vi ikke observerer en endring i genekspresjon av caspase 3.

---

Inhibitor of apoptosis (IAP) er en familie med cellulære proteiner som inhiberer apoptose. cIAP-1 kan beskytte cellene mot apoptotiske stimuli, men den eksakte mekanismen er fremdeles ukjent (Eckelman og Salvesen, 2006). Celler infisert med ILAV 2, 4 og 10 viser en relativt lik oppregulering av cIAP-1, mens celler infisert med ILAV 7 viser den høyeste oppreguleringen. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom celler infisert med ILAV 2 og ILAV 4, ILAV 4 og ILAV 7, samt mellom celler infisert med ILAV 2 og ILAV 10. Dette indikerer at endring i genekspresjonen av cIAP-1 ikke har en uttalt effekt på den ulike patogenisiteten som observeres *in vivo*.

Bcl-2 er et antiapoptotisk protein. Figur 4.23 viser at genekspresjonen av bcl-2 er uendret i celler infisert med de ulike isolatene i forhold til kontrollen. Tidligere studier har vist at bcl-2-mediert inhibering av apoptose induert av RNA-virus i humane celler kan føre til at viruset etablerer en persistent infeksjon. Det kan derfor tenkes at ekspresjonsprofilen til bcl-2 kan ha en viktig rolle i å avgjøre om et normalt cytolytisk virus vil forårsake en kronisk infeksjon. Andre studier har vist at bcl-2 interfererer med replikasjon av visse RNA-virus, inkludert influensavirus, men mekanismene for dette er ikke kjent (Nencioni *et al.*, 2003). ILAV 10 forårsaker en kronisk infeksjon *in vivo*, men gir ikke en høyere genekspresjon av bcl-2 i infiserte celler enn de andre isolatene.

Mcl-1 er i likhet med bcl-2 et antiapoptotisk protein som tilhører Bcl-2-familien. Proteinet er essensielt for utvikling og opprettholdelse av både B- og T-celler (Opferman *et al.*, 2003). Aminosyresekvensen til mcl-1 i atlantisk laks viser høy homologi med andre isoformer av dette genet fra mus, menneske og sebrafisk. Dette indikerer at mcl-1 også har en liknende antiapoptotisk funksjon i laks (Matejusova *et al.*, 2006). En studie utført av Hong *et al.* (1999) viste at IPNV induerte apoptose i en cellelinje fra laks ved å nedregulere ekspresjonen av mcl-1 (Hong *et al.*, 1999). Celler infisert med ILAV 4, 7 og 10 viser en statistisk signifikant oppregulering av mcl-1, men det er ingen signifikant forskjell mellom celler infisert med de ulike isolatene. Dette indikerer at en oppregulering av mcl-1 ikke påvirker patogenisiteten *in vivo* i særlig stor grad.

NFκB er en induserbar transkripsjonsfaktor som kontrollerer genekspresjonen av en rekke proinflammatoriske og antivirale cytokiner (Ludwig *et al.*, 2006). Ved en influensavirusinfeksjon ser det ut til at NFκB kan være involvert i økt virusreplikasjon, muligens via aktivering av caspaser som videre fører til økt effluks av virale RNP-

---

komplekser fra kjernen (Ludwig *et al.*, 2006). Celler infisert med alle de utvalgte virusisolatene viser en statistisk signifikant oppregulering av NFκB, men det er ingen signifikant forskjell mellom dem, noe som indikerer at NFκB ikke påvirker patogenisiteten *in vivo* i utstrakt grad.

Transaldolase 1 er et viktig enzym i den reversible, non-oksidative grenen i pentose-fosfatveien. En studie utført av Banki *et al.* (1996) viste at reduserte nivåer av transaldolase 1 i humane T-cellelinjer resulterte i økte GSH-nivåer som igjen inhiberte apoptose (Banki *et al.*, 1996). Celler infisert med ILAV 2, 7 og 10 viser den kraftigste nedreguleringen av transaldolase 1. Dette resultatet er også statistisk signifikant forskjellig fra celler infisert med ILAV 4 som viser en mindre nedregulering. Dersom transaldolase 1 har en liknende funksjon i ILAV-infiserte ASK-celler, så kan dette indikere at apoptose inhiberes i større grad i celler infisert med ILAV 2, 7 og 10 i forhold til celler infisert med ILAV 4. Inhibering av apoptose vil videre føre til at viruset får mer tid til å replikere.

Tumor suppressor proteinet p53 er en viktig komponent i en akutt stressrespons som forhindrer vekst og overlevelse av skadede eller unormale celler. Ulike genotoksiske stress, inkludert virale infeksjoner, øker transkripsjonsaktiviteten til p53, noe som videre induserer ekspresjon av gener som er involvert i stans i cellesyklus og apoptose. p53 er mest nedregulert i celler infisert med ILAV 2, 7 og 10. Dette resultatet er også statistisk signifikant forskjellig fra ekspresjonen i celler infisert med ILAV 4 som også er nedregulert, men i mindre grad. Dette kan indikere at spesielt ILAV 2, 7 og 10 motvirker ekspresjon av p53 og dermed hindrer at proteinet induserer ekspresjon av proapoptotiske gener.

p62 er et ubiquitin-bindende protein som kan ha en regulatorisk rolle knyttet til ubiquitin-systemet. Ubiquitin er et lite protein som finnes i alle eukaryote celler. Dette proteinet binder kovalent til andre proteiner som skal degraderes, enten fordi de ikke er funksjonelle eller fordi det er reguleringsproteiner som skal ha en kort levetid (Lam og Pickart, 2001). p62 er statistisk signifikant oppregulert i celler infisert med de fire isolatene. Dette kan indikere at ILAV-infeksjon fører til økte nivåer av ubiquitin og videre indusert ekspresjon av p62. Dette har sannsynligvis liten innvirkning på patogenisiteten som observeres *in vivo*, da det ikke er noen statistisk signifikant forskjell i ekspresjon av p62 i celler infisert med de ulike isolatene.

---

Fip-2 er et protein som kan indusere eller regulere apoptose ved å binde antiapoptotiske proteiner. Genekspresjonen av fip-2 oppreguleres blant annet i respons til TNF- $\alpha$  og IFN- $\alpha$ . Et fip-2-liknende gen har nylig blitt identifisert i atlantisk laks, men det er ukjent om dette genet har en analog funksjon til fip-2 genet (Collins *et al.*, 2007). Fip-2 er oppregulert i virusinfiserte celler, men det er ingen statistisk signifikant forskjell i genreguleringen mellom celler infisert med lav- og høypatogene ILAV-isolat. Oppreguleringen er størst i celler infisert med ILAV 7, som for øvrig også har den høyeste oppreguleringen av TNF- $\alpha$ . Dette kan indikere at dette genet induseres av TNF- $\alpha$  i ASK-celler. Det ser imidlertid ikke ut som en oppregulering av fip-2 påvirker patogenisiteten *in vivo* i særlig stor grad, da det ikke er noen statistisk signifikant forskjell i genreguleringen mellom celler infisert med de ulike isolatene.

Funksjonelle studier har vist at galektiner er involvert i celleaggregering og -adhesjon, proliferering, celledød og modulering av inflammasjon. Celler infisert med ILAV 2 viser en oppregulering av galektin-9 med en faktor på ca. 15. Dette resultatet er statistisk signifikant forskjellig fra ekspresjonen i celler infisert med de andre isolatene hvor det er en noe høyere oppregulering. En nyere studie viser at galektin-9 kan indusere apoptose av T<sub>H</sub>1-celler ved å binde til TIM-3 som uttrykkes selektivt på differensierte T-celler (Hirashima *et al.*, 2004). Hvis noe liknende finner sted i laks, kan dette indikere at ILAV 2 i mindre grad enn de andre isolatene er i stand til å indusere apoptose av T<sub>H</sub>1-celler. T<sub>H</sub>1-celler sekreterer IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  og TNF- $\beta$ , noe som videre fører til aktivering av makrofager, inflammasjon og produksjon av opsonerende antistoffer som øker fagocytose av patogener (Kondo og Martin, 2001) og (Parham, 2005). En kraftigere adaptiv immunrespons, inkludert økt inflammasjon ved en ILAV 2-infeksjon i forhold til infeksjoner med de andre isolatene, kan være en årsak til det akutte sykdomsforløpet som dette isolatet fører til, samt bidra til økt mortalitet. Celler infisert med ILAV 7 og ILAV 10 viser også en høy oppregulering av galektin-9, noe som vil kunne føre til apoptose av T<sub>H</sub>1-celler. Dette kan indikere at en T<sub>H</sub>1-cellerespons ikke er avgjørende for å hindre replikasjon og eliminere patogenet ved en infeksjon forårsaket av disse isolatene. Figur 4.33 viser at galektin-9 også uttrykkes på proteinnivå i celler infisert med ILAV 4, 7 og 10. Det var imidlertid ikke mulig å detektere proteinet i prøver fra uinfiserte celler eller celler infisert med ILAV 2. Dette forsøket ble gjentatt flere ganger med prøver fra tre ulike infeksjonsforsøk. I prøver fra to av infeksjonsforsøkene var det mulig å detektere bånd fra prøver isolert fra celler infisert med ILAV 4, 7 og 10. Dette indikerer at

---

indusert ekspresjon av galektin-9 på mRNA-nivå også fører til økt ekspresjon på protein-nivå.

### 5.2.3 Proteinekspresjon av stressrespons-proteinene p38 og ERK

p38 er en mitogen-aktivert protein kinase, hvor den enzymatiske aktiviteten til kinasen i stor grad påvirkes av eksterne stimuli og stressfaktorer som for eksempel IL-1, TGF- $\beta$  og TNF. De viktigste konsekvensene av aktivering av p38 er økt ekspresjon av mRNA som koder for cytokiner og reseptorer involvert i inflammasjon og immunitet (Ashwell, 2006). Som vist i figur 4.31 er det kun mulig å detektere et svakt bånd på ca. 38 kDa når det ble benyttet et antistoff mot p38. Båndene har også en relativt lik intensitet for de ulike prøvene, selv om den kanskje er noe kraftigere i kontrollcellene. De svake båndene kan tyde på at antistoffet mot p38 ikke fungerer optimalt, noe som kan skyldes at dette er et antistoff mot den humane utgaven av p38. Ved bruk av antistoffet mot fosforylert p38 kan det detekteres relativt sterke bånd ved 38 kDa både i lysat fra kontrollceller samt infiserte celler. En studie utført av Hansen og Jørgensen (2007) viste at lipopolysakkarid (LPS), CpG-oligonukleotider og IL-1 $\beta$  induserte fosforylering av p38 i hodenyre-makrofager fra atlantisk laks (Hansen og Jørgensen, 2007). I vårt tilfelle skulle en forvente at en ILAV-infeksjon ville føre til økt fosforylering av p38 slik at det var sterkere bånd i prøver fra infiserte celler i forhold til kontrollceller. Det kan være flere årsaker til at dette ikke kan detekteres. En mulig forklaring er at tidspunktet for prøvetaking (tre dager etter infeksjon) ikke er optimalt i forhold til kinetikken for fosforylering av p38. Dersom proteinet fosforyleres og defosforyleres svært tidlig i infeksjonsforløpet så vil ikke dette kunne detekteres i prøver tatt på dag tre. En studie utført av Han *et al.* (1994) gir et eksempel på en slik kinetikk, hvor tilsetning av en hyperosmolar løsning til humane celler induserte fosforylering av p38 innen 5 minutter (Han *et al.*, 1994). En annen forklaring kan være at det faktisk er en reell forskjell i fosforyleringsgrad av p38, men at dette ikke kan detekteres på westernblottet. For å vurdere mengden protein ser en på størrelsen og intensiteten til westernbåndet. Ved store mengder protein kan det være vanskelig å se en forskjell mellom ulike prøver. Dette kan føre til at mindre, men viktige forskjeller i fosforyleringsgrad ikke kan observeres ved denne metoden.

Ekstracellulær signalregulert kinase (ERK) aktiveres av blant annet vekstfaktorer, cytokiner og virusinfeksjoner (Johnson og Lapadat, 2002). Membranakkumulering av HA fra influensavirus type A fører til aktivering av Raf/MEK/ERK-signalkaskaden, noe som trigger



---

eksport av RNP fra kjernen og dermed øker virusproduksjonen (Marjuki *et al.*, 2006). Nylig har det også blitt vist at økt viral polymeraseaktivitet promoterer replikasjon og transkripsjon av viralt RNA, noe som fører til økt akkumulering av HA på celleoverflaten og videre en oppregulering av MAPK-kaskaden. Dette vil gi en mer effektiv eksport av RNP fra kjernen i tillegg til økt virusproduksjon (Marjuki *et al.*, 2007). Dersom membranakkumulering av HE fra ILAV fører til aktivering av ERK på samme som HA fra influensavirus, skulle en forvente å se en økt fosforylering av dette proteinet i cellelysat fra infiserte celler i forhold til kontrollceller. Westernblottet av fosforylert ERK, viser derimot ingen synlige forskjeller mellom kontroll og infiserte celler. Dette kan, i likhet med fosforylert p38, skyldes at proteinet er hyperfosforylert på et tidligere eller senere tidspunkt i forhold til vår prøvetaking. Viral replikasjon av ILAV (basert på PCR av segment 7) er størst i celler infisert med ILAV 2, 7 og 10, noe som kan skyldes aktivering av ERK på et tidligere tidspunkt. Eventuelt kan økt viral replikasjon føre til økt fosforylering av ERK på et senere tidspunkt, noe som da kan gi seg utslag i endring i replikasjon for de ulike isolatene. En annen årsak til at vi ikke observerer en forskjell i fosforylering mellom infiserte og uinfiserte celler, kan være at ERK ikke aktiveres ved membranakkumulering av HE.

#### **5.2.4 Proteinekspresjon av hemagglutinin-esterase**

For å vurdere replikasjonen til de ulike isolatene ble det i tillegg til vurdering av genekspresjon av segment 7, utført en westernblotting med antistoffet 6AD/ 9Z som er et antistoff mot hemagglutinin-esterase. Som vist i figur 4.34 kan det se ut som om båndintensiteten til HE er sterkere for prøver fra celler infisert med ILAV 7 og ILAV 10 enn for celler infisert med de andre isolatene. Dette kan indikere at det er mer hemagglutinin-esterase i celler infisert med de lavpatogene isolatene ILAV 7 og ILAV 10, og at disse isolatene derfor replikerer i større grad enn de høypatogene isolatene ILAV 2 og ILAV 4. Dette kan videre indikere at ILAV 7 og ILAV 10 er avhengig av en adaptiv immunrespons for å hindre replikasjon og dermed eliminere patogenet, mens ILAV 2 og ILAV 4 i større grad inhiberes av det medfødte immunforsvaret.

Som vist i figuren er det to bånd med en molekylvekt på rundt 35 og 40 kDa i prøvene fra celler infisert med ILAV 2. Prøvene fra celler infisert med de andre isolatene viser derimot kun ett bånd ved rundt 40 kDa. Forsøket ble gjentatt med prøver fra tre infeksjonsforsøk og i alle tilfellene var det mulig å detektere to bånd i prøver fra celler infisert med ILAV 2. I ett

---

av forsøkene kunne det i tillegg se ut som det var to bånd i prøvene fra celler infisert med ILAV 10. Det er usikkert hva som er årsaken til dette. En mulig forklaring kan være at HE har flere glykosyleringssteder, slik at de observerte båndene er henholdsvis en glykosylert og en uglykosylert form av proteinet. For å undersøke dette ble HE-sekvensen til de ulike isolatene undersøkt ved hjelp av programvaren NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) som finner sannsynlige N-glykosyleringssteder. Som vist i vedlegg 3 er det kun ett glykosyleringssete i HE-sekvensen til ILAV 2. Det samme glykosyleringssetet finnes hos alle isolatene, noe som utelukker dette som en mulig forklaring.

---

## 6. Konklusjon

- Det var ingen synlig forskjell basert på immunofluorescens mellom de fire ILAV-isolatenes evne til å infisere ASK-celler *in vitro*.
- De ulike ILAV-isolatene ser ut til å påvirke genekspresjonen av stort sett de samme stressrelaterte genene, men i ulik grad.
- Det høypatogene isolatet ILAV 4 ser ut til å inducere en kraftigere stimulering av interferonsystemet enn de de andre isolatene, mens ILAV 2 ser ut til å inducere en svak stimulering av interferonsystemet.
- Basert på genekspresjon av Hsp 70 (som kan inducere proliferering av CD4 T-celler og CD8 T-celleresponser), ser det ut som om ILAV 7 og ILAV 10 inducerer en kraftigere stimulering av det adaptive immunsystemet enn ILAV 2 og ILAV 4. Dette gjenspeiles imidlertid ikke på proteinnivå, noe som gjør denne observasjonen tvilsom. Det ser også ut som om ILAV 4, 7 og 10 inducerer en kraftigere ekspresjon av galektin-9 enn ILAV 2, noe som også gjenspeiles på proteinnivå.
- ILAV-isolatene ser ikke ut til å inducere fosforylering av stressrespons-proteinene p38 og ERK.

---

## Kildeliste

- Arya, M., I. S. Shergill, et al. (2005).** "Basic principles of real-time quantitative PCR." *Expert Review of Molecular Diagnostics* **5**(2): 209-219.
- Ashwell, J. D. (2006).** "The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system." *Nature Reviews Immunology* **6**(7): 532-540.
- Aspehaug, V., K. Falk, et al. (2004).** "Infectious salmon anemia virus (ISAV) genomic segment 3 encodes the viral nucleoprotein (NP), an RNA-binding protein with two monopartite nuclear localization signals (NLS)." *Virus Research* **106**(1): 51-60.
- Aspehaug, V., A. B. Mikalsen, et al. (2005).** "Characterization of the infectious salmon anemia virus fusion protein." *Journal of Virology* **79**(19): 12544-12553.
- Banki, K., E. Hutter, et al. (1996).** "Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression." *Journal of Biological Chemistry* **271**(51): 32994-33001.
- Barber, G. N. (2001).** "Host defense, viruses and apoptosis." *Cell Death and Differentiation* **8**(2): 113-126.
- Biering, E., K. Falk, et al. (2002).** "Segment 8 encodes a structural protein of infectious salmon anaemia virus (ISAV); the colinear transcript from Segment 7 probably encodes a non-structural or minor structural protein." *Diseases of Aquatic Organisms* **49**(2): 117-122.
- Bird, S., J. Zou, et al. (2002).** "Evolution of interleukin-1[beta]." *Cytokine & Growth Factor Reviews* **13**(6): 483-502.
- Bjerrum, O. J., Heegaard, Nils HH (2001).** Western Blotting Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Blom, B. (2001).** Immune System: In Vitro Study Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003).** "Mechanisms of caspase activation." *Current Opinion in Cell Biology* **15**(6): 725-731.
- Branschädel, M., V. Boschert, et al. (2007).** Tumour Necrosis Factors Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Carey, M. A., J. A. Bradbury, et al. (2005).** "Contrasting effects of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 deficiency on the host response to influenza A viral infection." *Journal of Immunology* **175**(10): 6878-6884.
- Caunt, C. J., A. R. Finch, et al. (2006).** "Seven-transmembrane receptor signalling and ERK compartmentalization." *Trends in Endocrinology and Metabolism* **17**(7): 276-283.
- Chen, Y. Y., R. H. Sun, et al. (2001).** "Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis?" *Febs Letters* **509**(2): 191-196.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2006).** "Dissecting p53-dependent apoptosis." *Cell Death and Differentiation* **13**(6): 994-1002.

- 
- Collins, C. M., K. Olstad, et al. (2007).** "Isolation of a FIP2-like gene from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), found upregulated following infection with the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957." *Fish & Shellfish Immunology* **22**(3): 282-288.
- Dannevig, B. H., K. Falk, et al. (1995).** "Isolation of the Causal Virus of Infectious Salmon Anemia (Isa) in a Long-Term Cell-Line from Atlantic Salmon Head Kidney." *Journal of General Virology* **76**: 1353-1359.
- Das, S., S. A. Boswell, et al. (2008).** "P53 promoter selection - Choosing between life and death." *Cell Cycle* **7**(2): 154-157.
- Davies, D. H. (2001).** Immune System Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Deveraux, Q. L. and T. C. Reed (1999).** "IAP family proteins - suppressors of apoptosis." *Genes & Development* **13**(3): 239-252.
- Durtschi, J. D., J. Stevenson, et al. (2007).** "Evaluation of quantification methods for real-time PCR minor groove binding hybridization probe assays." *Analytical Biochemistry* **361**(1): 55-64.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999).** "Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annual Review of Biochemistry* **68**: 383-424.
- Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006).** "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases." *Journal of Biological Chemistry* **281**(6): 3254-3260.
- Falk, K., V. Aspehaug, et al. (2004).** "Identification and characterization of viral structural proteins of infectious salmon anemia virus." *Journal of Virology* **78**(6): 3063-3071.
- Falk, K., E. Namork, et al. (1998).** "Characterization and applications of a monoclonal antibody against infectious salmon anaemia virus." *Diseases of Aquatic Organisms* **34**(2): 77-85.
- Fields, B. N., D. M. Knipe, et al. (2007).** Fields' virology. Philadelphia, Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fritschy, J.-M. (2001).** Immunofluorescence. Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Garcia-Rosado, E., T. Markussen, et al. (2008).** "Molecular and functional characterization of two infectious salmon anaemia virus (ISAV) proteins with type I interferon antagonizing activity." *Virus Research* **133**(2): 228-238.
- Garcia, M. A., E. F. Meurs, et al. (2007).** "The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control." *Biochimie* **89**(6-7): 799-811.
- Geetha, T. and M. W. Wooten (2002).** "Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62." *Febs Letters* **512**(1-3): 19-24.
- Gürtler, L. (2006).** "Virology of Human Influenza." *from* <http://www.influenzareport.com/ir/virol.htm>.
- Haller, O., M. Frese, et al. (1998).** "Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses." *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties* **17**(1): 220-230.

- 
- Haller, O., G. Kochs, et al. (2006).** "The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses." *Virology* **344**(1): 119-130.
- Han, J., J. D. Lee, et al. (1994).** "A Map Kinase Targeted by Endotoxin and Hyperosmolarity in Mammalian-Cells." *Science* **265**(5173): 808-811.
- Hansen, T. E. and J. B. Jorgensen (2007).** "Cloning and characterisation of p38 MAP kinase from Atlantic salmon - A kinase important for regulating salmon TNF-2 and IL-1 beta expression." *Molecular Immunology* **44**(12): 3137-3146.
- Haug, M., L. Dannecker, et al. (2005).** "The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4(+) memory T cells." *European Journal of Immunology* **35**(11): 3163-3172.
- Herman, B. (2003).** Fluorescence Microscopy. Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Hirashima, M., Y. Kashio, et al. (2004).** "Galectin-9 in physiological and pathological conditions." *Glycoconjugate Journal* **19**(7-9): 593-600.
- Hong, J. R., Y. L. Hsu, et al. (1999).** "Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis due to down-regulation of survival factor MCL-1 protein expression in a fish cell line." *Virus Research* **63**(1-2): 75-83.
- Huising, M. O., R. J. M. Stet, et al. (2004).** "The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish." *Developmental & Comparative Immunology* **28**(5): 395-413.
- Jensen, I., A. Albuquerque, et al. (2002).** "Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon." *Fish & Shellfish Immunology* **13**(4): 311-326.
- Jin, Z. Y. and W. S. El-Deiry (2005).** "Overview of cell death signaling pathways." *Cancer Biology & Therapy* **4**(2): 139-163.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002).** "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-1912.
- Jorgensen, S. M., E. J. Kleveland, et al. (2006).** "Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon." *Marine Biotechnology* **8**(4): 398-408.
- Joseph, T., A. Cepica, et al. (2004).** "Mechanism of cell death during infectious salmon anemia virus infection is cell type-specific." *Journal of General Virology* **85**: 3027-3036.
- Karge, W. H., E. J. Schaefer, et al. (1998).** Quantification of mRNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) Using an Internal Standard and a Nonradioactive Detection Method. **110**: 43-61.
- Kibenge, F. S., K. Munir, et al. (2004).** "Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity." *Animal Health res rev*(5): 65-78.
- Kibenge, F. S. B., H. T. Xu, et al. (2007).** "Characterization of gene expression on genomic segment 7 of infectious salmon anaemia virus." *Virology Journal* **4**.

- 
- Kileng, O., M. I. Brundtland, et al. (2007).** "Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon." *Fish & Shellfish Immunology* **23**(2): 378-389.
- Kochs, G., A. Garcia-Sastre, et al. (2007).** "Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein." *Journal of Virology* **81**(13): 7011-7021.
- Kondo, T. and R. Martin (2001).** T Lymphocytes: Helpers Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Kontsek, P., G. Karayianni-Vasconcelos, et al. (2003).** "The human interferon system: Characterization and classification after discovery of novel members." *Acta Virologica* **47**(4): 201-215.
- Krossoy, B., I. Hordvik, et al. (1999).** "The putative polymerase sequence of infectious salmon anemia virus suggests a new genus within the Orthomyxoviridae." *Journal of Virology* **73**(3): 2136-2142.
- Kuusisto, E., T. Suuronen, et al. (2001).** "Ubiquitin-Binding Protein p62 Expression Is Induced during Apoptosis and Proteasomal Inhibition in Neuronal Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**(1): 223-228.
- Lam, Y. A. and C. M. Pickart (2001).** Ubiquitin Pathway Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Larsen, R., T. P. Rokenes, et al. (2004).** "Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein." *Journal of Virology* **78**(15): 7938-7944.
- Li, Y. G., J. Kang, et al. (1998).** "Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains." *Molecular and Cellular Biology* **18**(3): 1601-1610.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001).** "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Ludwig, S., S. Pleschka, et al. (2006).** "Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells." *Cellular Microbiology* **8**(3): 375-386.
- MacFarlane, M. and A. C. Williams (2004).** "Apoptosis and disease: a life or death decision - Conference and Workshop on Apoptosis and Disease." *Embo Reports* **5**(7): 674-678.
- Marjuki, H., M. I. Alam, et al. (2006).** "Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase C alpha-mediated activation of ERK signaling." *Journal of Biological Chemistry* **281**(24): 16707-16715.
- Marjuki, H., H. L. Yen, et al. (2007).** "Higher polymerase activity of a human influenza virus enhances activation of the hemagglutinin-induced Raf/MEK/ERK signal cascade." *Virology Journal* **4**.
- Markussen, T., C. M. Jonassen, et al. (2008).** "Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus." *Virology* **374**(2): 515-527.
- Matejusova, I., B. Felix, et al. (2006).** "Gene expression profiles of some immune relevant genes from skin of susceptible and responding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)

- 
- infected with *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) revealed by suppressive subtractive hybridisation." *International Journal for Parasitology* **36**(10-11): 1175-1183.
- Meager, A. and M. Wadhwa (2007).** Interleukins. Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Michels, J., P. W. M. Johnson, et al. (2005).** "Mcl-1." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**(2): 267-271.
- Min, J. Y. and R. M. Krug (2006).** "The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(18): 7100-7105.
- Mjaaland, S., O. Hungnes, et al. (2002).** "Polymorphism in the Infectious Salmon Anemia Virus Hemagglutinin Gene: Importance and Possible Implications for Evolution and Ecology of Infectious Salmon Anemia Disease." *Virology* **304**(2): 379-391.
- Mjaaland, S., T. Markussen, et al. (2005).** "Susceptibility and immune responses following experimental infection of MHC compatible Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with different infectious salmon anaemia virus isolates." *Archives of Virology* **150**(11): 2195-216.
- Multhoff, G. (2007).** "Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance." *Methods* **43**(3): 229-237.
- Nachmias, B., Y. Ashhab, et al. (2004).** "The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer." *Seminars in Cancer Biology* **14**(4): 231-243.
- Naito, T., F. Momose, et al. (2007).** "Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits." *Journal of Virology* **81**(3): 1339-1349.
- Nakae, S., M. Asano, et al. (2001).** "Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production." *Immunology* **104**(4): 402-409.
- Nencioni, L., A. Iuvara, et al. (2003).** "Influenza A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2." *Faseb Journal* **17**(2): 758-+.
- Neumann, G. and Y. Kawaoka (2007).** Influenza viruses Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Nolan, T., R. E. Hands, et al. (2006).** "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nature Protocols* **1**(3): 1559-1582.
- Okamura, H., S.-i. Kashiwamura, et al. (1998).** "Regulation of interferon-[gamma] production by IL-12 and IL-18." *Current Opinion in Immunology* **10**(3): 259-264.
- Opferman, J. T., A. Letai, et al. (2003).** "Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1." *Nature* **426**(6967): 671-676.
- Parham, P. (2005).** The Immune System, Garland Science.
- Perl, A. (2007).** "The pathogenesis of transaldolase deficiency." *Humana Life* **59**(6): 365-373.
- Pestka, S., C. D. Krause, et al. (2004).** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **202**: 8-32.



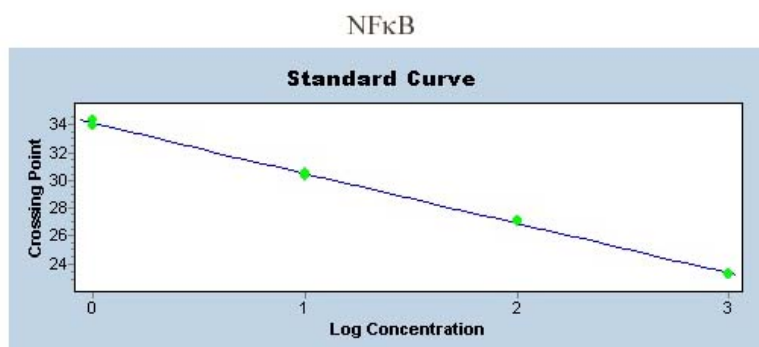
- 
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002).** Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **30**: e36-.
- Pirkkala, L. and L. Sistonen (2006).** Heat Shock Proteins (HSPs): Structure, Function and Genetics Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Rimstad, E. and S. Mjaaland (2002).** "Infectious salmon anaemia virus - An orthomyxovirus causing an emerging infection in Atlantic salmon." *Apmis* **110**(4): 273-282.
- Ritchie, K. J. and D. E. Zhang (2004).** "ISG15: the immunological kin of ubiquitin." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15**(2): 237-246.
- Ritchie, R. J., J. Heppell, et al. (2001).** "Identification and characterization of segments 3 and 4 of the ISAV genome." *Virus Genes* **22**(3): 289-297.
- Robertsen, B. (2006).** "The interferon system of teleost fish." *Fish & Shellfish Immunology* **20**(2): 172-191.
- Robertsen, B., V. Bergan, et al. (2003).** "Atlantic salmon interferon genes: Cloning, sequence analysis, expression, and biological activity." *Journal of Interferon and Cytokine Research* **23**(10): 601-612.
- Rolland, J. B., D. Bouchard, et al. (2005).** "Combined use of the ASK and SHK-1 cell lines to enhance the detection of infectious salmon anemia virus." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **17**(2): 151-157.
- Roulston, A., R. C. Marcellus, et al. (1999).** "Viruses and apoptosis." *Annual Review of Microbiology* **53**: 577-628.
- Samuel, C. E. (2001).** "Antiviral actions of interferons." *Clinical Microbiology Reviews* **14**(4): 778-809.
- Savan, R., T. Kono, et al. (2005).** "A novel tumor necrosis factor (TNF) gene present in tandem with the TNF-alpha gene on the same chromosome in teleosts." *Immunogenetics* **57**(1-2): 140-150.
- Schnell, J. R. and J. J. Chou (2008).** "Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus." *Nature* **451**(7178): 591-U12.
- Schumann, W. (2001).** Heat Shock Response. Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Shaul, Y. D. and R. Seger (2007).** "The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions." *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1773**(8): 1213-1226.
- Snow, M., R. Ritchie, et al. (2003).** "Isolation and characterisation of segment 1 of the infectious salmon anaemia virus genome." *Virus Research* **92**(1): 99-105.
- Steer, S. A. and J. A. Corbett (2003).** "The role and regulation of COX-2 during viral infection." *Viral Immunology* **16**(4): 447-460.
- Tian, B. and A. R. Brasier (2003).** Identification of a nuclear factor kappa beta-dependent gene network. Recent Progress in Hormone Research, Vol 58. **58**: 95-130.
- Turpin, E., M. Luke, et al. (2005).** "Influenza virus infection increases p53 activity: Role of p53 in cell death and viral replication." *Journal of Virology* **79**(14): 8802-8811.

- 
- Vitenskapskomiteen, f. m. (2007).** "Which risk factors relating to spread of Infectious Salmon Anaemia (ISA) require development of management strategies." *from* <http://www.vkm.no/eway/library/openForm.aspx?param1=17005&param5=read>.
- Watanabe, M., M. Hitomi, et al. (2002).** "The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs." *Microscopy and Microanalysis* **8**(5): 375-391.
- Westirmeier, R. (2005).** Gel Electrophoresis Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Winter, P. C. (2005).** Polymerase Chain Reaction (PCR). Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Wu, M., H. F. Ding, et al. (2001).** Apoptosis: Molecular Mechanisms. Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley & Sons.
- Wurzer, W. J., C. Ehrhardt, et al. (2004).** "NF-kappa B-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation." *Journal of Biological Chemistry* **279**(30): 30931-30937.
- Yang-Yen, H. F. (2006).** "Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller." *Journal of Biomedical Science* **13**(2): 201-204.
- Youle, R. J. and A. Strasser (2008).** "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**(1): 47-59.
- Zagon, I. S., K. A. Rahn, et al. (2007).** "Opioids and migration, chemotaxis, invasion, and adhesion of human cancer cells." *Neuropeptides* **41**(6): 441-452.
- Zagon, I. S., M. F. Verderame, et al. (2002).** "The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr)." *Brain Research Reviews* **38**(3): 351-376.
- Zhu, C., A. C. Anderson, et al. (2005).** "The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity." *Nature Immunology* **6**(12): 1245-1252.

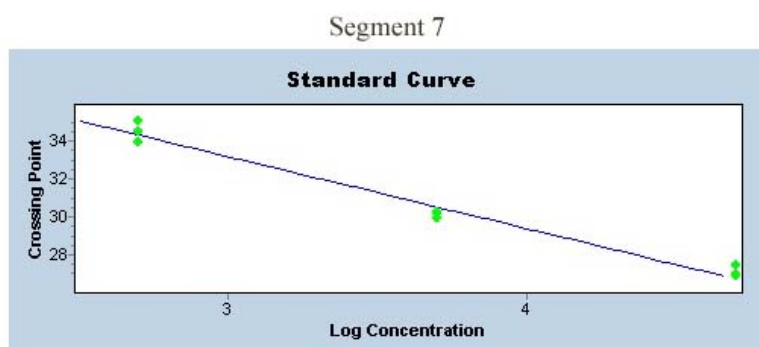
# Vedlegg 1

## Standardkurver

E-verdi: 1,899  
Error: 0,0145



E-verdi: 1,841  
Error: 0,160



## Vedlegg 2

### Alignment: s7ORF1 (DQ785260, DQ785262, DQ785265 og DQ785268)

			1	50
ILAV 2	s7ORF1	(1)	MDFTKVYGVLDQLKLHGKDKVLNRFLWGLSLKHVIKYKENVQNMMSGVNF	
ILAV 4	s7ORF1	(1)	MDFTKVYGVLDQLKLHGKDKVLNRFLWGLSLKHVIKYKENVQNMMSGVNF	
ILAV 7	s7ORF1	(1)	MDFTKVYGVLDQLKLHGKDKVLNRFLWGLSLKHVIKYKENVQNMMSGVNF	
ILAV 10	s7ORF1	(1)	MDFTKVYGVLDQLKLHGKDKVLNRFLWGLSLKHVIKYKENVQNMMSGVNF	
			51	100
ILAV 2	s7ORF1	(51)	EVMVPEQGGKVVFSLTEMGSCVSCYGDDEPDEGSCELASENMDFPSCPLG	
ILAV 4	s7ORF1	(51)	EVMVPEQGGKVVFSLTEMGSCVSCYGDDEPDEGSCELASENMDFPSCPLG	
ILAV 7	s7ORF1	(51)	EVMVPEQGGKVVFSLTEMGSCVSCYGDDEPDEGSCELASENMDFPSCPLG	
ILAV 10	s7ORF1	(51)	EVMVPEQGGKVVFSLTEMGSCVSCYGDDEPDEGSCELASENMDFPSCPLG	
			101	150
ILAV 2	s7ORF1	(101)	NGDDFCLSLALSTMWSGMTRRNNFMDRFIGSLVHCTPVMIWLYEKMARR	
ILAV 4	s7ORF1	(101)	NGDDFCLSLALSTMWSGMTRRNNFMDRFIGSLVHCTPVMIWLYEKMARR	
ILAV 7	s7ORF1	(101)	NGDDFCLSLALSTMWSGMTRRNNFMDRFIGSLVHCTPVMIWLYEKMARR	
ILAV 10	s7ORF1	(101)	NGDDFCLSLALSTMWSGMTRRNNFMDRFIGSLVHCTPVMIWLYEKMARR	
			151	200
ILAV 2	s7ORF1	(151)	NHHKMVCHTCPDEHKFSEKDELQGYEECLEASTDIFLDELATVVTGGFF	
ILAV 4	s7ORF1	(151)	NHHKMVCHTCPDEHKFSEKDELQGYEECLEASTDIFLDELATVVTGGFF	
ILAV 7	s7ORF1	(151)	NHHKMVCHTCPDEHKFSEKDELQGYEECLEASTDIFLDELATVVTGGFF	
ILAV 10	s7ORF1	(151)	NHHKMVCHTCPDEHKFSEKDELQGYEECLEASTDIFLDELATVVTGGFF	
			201	250
ILAV 2	s7ORF1	(201)	PVGLKGSWGGWYLKYVRYAGPLEGSSGFIVNQRFYDRAQNRAQSRVSMV	
ILAV 4	s7ORF1	(201)	PVGLKGSWGGWYLKYVRYAGPLEGSSGFIVNQRFYDRAQNRAQSRVSMV	
ILAV 7	s7ORF1	(201)	PVGLKGSWGGWYLKYVRYAGPLEGSSGFIVNQRFYDRAQNRAQSRVSMV	
ILAV 10	s7ORF1	(201)	PVGLKGSWGGWYLKYVRYAGPLEGSSGFIVNQRFYDRAQNRAQSRVSMV	
			251	300
ILAV 2	s7ORF1	(251)	EMDRDGVSFIIYEKPSIYHSDGCTGTAARVWRRDHNERAGVELRAGLHFRM	
ILAV 4	s7ORF1	(251)	EMDRDGVSFIIYEKPSIYHSDGCTGTAARVWRRDHNERAGVELRAGLHFRM	
ILAV 7	s7ORF1	(251)	EMDRDGVSFIIYEKPSIYHSDGCTGTAARVWRRDHNERAGVELRAGLHFRM	
ILAV 10	s7ORF1	(251)	EMDRDGVSFIIYEKPSIYHSDGCTGTAARVWRRDHNERAGVELRAGLHFRM	

### Alignment: s8ORF2 (DQ785274, DQ785276, DQ78279 og DQ785282)

			1	50
ILAV 2	s8ORF2	(1)	MDTKTSTMHERSKPQTGTGVDQTCTEGEEEARSSLRNGSATYTWGRKRV	
ILAV 4	s8ORF2	(1)	MDTKTSTMHERSKPQTGTGVDQTCTEGEEEARSSLRNGSATYTWGRKRV	
ILAV 7	s8ORF2	(1)	MDTKTSTMHERSKPQTGTGVDQTCTEGEEEARSSLRNGSATYTWGRKRV	
ILAV 10	s8ORF2	(1)	MDTKTSTMHERSKPQTGTGVDQTCTEGEEEARSSLRNGSATYTWGRKRV	
			51	100
ILAV 2	s8ORF2	(51)	RVPGRRENGESQNLPIGERNDQSSDDDSLCDERSTVWKHGDTDEGSH	
ILAV 4	s8ORF2	(51)	RVPGRRENGESQNLPIGERNDQSSDDDSLCDERSTVWKHGDTDEGSH	
ILAV 7	s8ORF2	(51)	RVPGRRENGESQNLPIGERNDQSSDDDSLCDERSTVWKHGDTDEGSH	
ILAV 10	s8ORF2	(51)	RVPGRRENGESQNLPIGERNDQSSDDDSLCDERSTVWKHGDTDEGSH	
			101	150
ILAV 2	s8ORF2	(101)	QKLAEGVRMPRRGWWRGKVGNGVWYDFTRHGGGEDDVEGPEDNATQQDA	
ILAV 4	s8ORF2	(101)	QKLAEGVRMPRRGWWRGKVGNGVWYDFTRHGGGEDDVEGPEDNATQQDA	
ILAV 7	s8ORF2	(101)	QKLAEGVRMPRRGWWRGKVGNGVWYDFTRHGGGEDDVEGPEDNATQQDA	
ILAV 10	s8ORF2	(101)	QKLAEGVRMPRRGWWRGKVGNGVWYDFTRHGGGEDDVEGPEDNATQQDA	
			151	200
ILAV 2	s8ORF2	(151)	DVCSRSEFESPGNFRKGHRRCSSTSGILLDREDGAPGVPEISPAEKLEA	
ILAV 4	s8ORF2	(151)	DVCSRSEFESPGNFRKGHRRCSSTSGILLDREDGAPGVPEISPAEKLEA	
ILAV 7	s8ORF2	(151)	DVCSRSEFESPGNFRKGHRRCSSTSGILLDREDGAPGVPEISPAEKLEA	
ILAV 10	s8ORF2	(151)	DVCSRSEFESPGNFRKGHRRCSSTSGILLDREDGAPGVPEISPAEKLEA	
			201	241
ILAV 2	s8ORF2	(201)	ERKKLSELDDKIYKLRRRLRKMEYKKMGINREIDQLEDSVQ	
ILAV 4	s8ORF2	(201)	ERKKLSELDDKIYKLRRRLRKMEYKKMGINREIDQLEDSVQ	
ILAV 7	s8ORF2	(201)	ERKKLSELDDKIYKLRRRLRKMEYKKMGINREIDQLEDSVQ	
ILAV 10	s8ORF2	(201)	ERKKLSELDDKIYKLRRRLRKMEYKKMGINREIDQLEDSVQ	

---

## Vedlegg 3

### N-glykosyleringsprediksjon

Position	Potential	Jury	N-Glyc agreement result
HE, ILAV 2	333 NITD	0.6504	(9/9) ++
HE, ILAV 4	333 NITD	0.6586	(9/9) ++
HE, ILAV 4	349 NQTM	0.4166	(8/9) -
HE, ILAV 7	333 NITD	0.6576	(9/9) ++
HE, ILAV 7	349 NQTM	0.4152	(8/9) -
HE, ILAV 10	333 NITD	0.6569	(9/9) ++
HE, ILAV 10	386 NLSV	0.5119	(5/9) +